

# MÉTODOS DE RECOLHA DE VESTÍGIOS BIOLÓGICOS COM ZARAGATOAS - ESTUDO COMPARATIVO

Ashley Lima Capitão

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Mestrado em Genética Forense

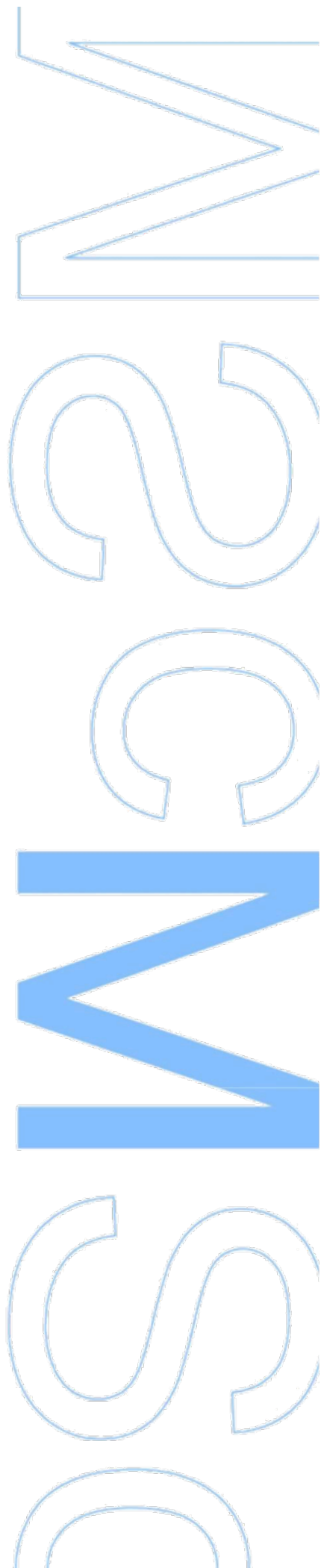
2016

## **Orientação**

Doutora Laura Cainé, Faculdade de Medicina da Universidade  
do Porto (FMUP) e Instituto Nacional de Medicina Legal e  
Ciências Forenses, I.P. (INMLCF)

Mestre Benedita Ferreira da Silva, Instituto Nacional de  
Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF)

Mestre Joana Cerqueira, Instituto Nacional de Medicina Legal  
e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF)





Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**N**

**S**

**U**



Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Genética Forense, submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P (INMLCF), sob a orientação científica da Doutora Laura Cainé e coorientações da Mestre Benedita Ferreira da Silva e da Mestre Joana Cerqueira.

Dissertation for applying for a Master's degree in Forensic Genetics, submitted to the Faculty of Sciences of the University of Porto.

The present work was developed at the National Institute of Legal Medicine and Other Forensic Sciences, under the scientific supervision of Laura Cainé, MD, PhD, Benedita Ferreira da Silva, MsC and Joana Cerqueira, MsC.



## Agradecimentos

À Doutora Laura Cainé e à Mestre Joana Cerqueira, um especial obrigada por me terem aceite como sua orientanda e me terem guiado neste percurso, transmitindo sempre os seus conhecimentos ao longo do caminho.

À Mestre Benedita Ferreira da Silva pelo acompanhamento contínuo, pela paciência e boa disposição, pela dedicação e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo deste ano, o meu muito obrigada.

À Dida e à Joana, pelo companheirismo, pela amizade e por todos os momentos ao longo dos últimos anos que farão esta amizade perdurar no tempo, ainda que separadas por Portugal inteiro... obrigada por terem tornado estes anos os melhores. À Mónica que mais do que ninguém acompanhou todo este processo, porque todas as dificuldades com que nos deparamos e todas as preocupações que tivemos seriam muito piores de lidar se não estivéssemos juntas nisto, o meu sincero obrigada.

À Jéssica, Catarina e Marta, irmãs emprestadas, pelos (muitos) anos de amizade, por crescerem comigo e por tudo aquilo que já passamos juntas... não podia deixar de vos agradecer pelo papel importante que têm na minha vida.

Aos meus pais, avós e irmã, sem o vosso esforço, apoio e incentivo ao longo de todo o meu percurso académico nada disto seria possível... Muito Obrigada por serem quem são!

Ao Fábio, a quem não há palavras para descrever o quão importante foi o teu papel nesta etapa nem o quão agradecida te estou, não só pelas inúmeras tardes e noites dedicadas à concretização deste projeto, mas também por todo o apoio emocional e sobretudo por nunca me teres deixado desistir de acreditar nas minhas capacidades, no meu sucesso e nos meus sonhos. Obrigada por me fazeres todos os dias melhor.

Aos nossos voluntários, sem os quais este projeto não teria sido possível, os meus agradecimentos por terem efetuado a recolha com a maior seriedade e por continuarem a ser nossos amigos após um pedido tão singular!

A todos os outros que não mencionei mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para ser quem sou, o meu muito obrigada!





## RESUMO

As agressões sexuais são um dos crimes mais prevalentes na nossa sociedade, perpetradas maioritariamente contra mulheres. Assim, a detecção de sémen na vítima e/ou na cena do crime é essencial a fim de provar o contato sexual e identificar o perpetrador, através da análise de DNA.

A presente investigação pretende comparar as três variantes do método “clássico” e a “*double swabbing technique*”, de modo a aferir qual permite a obtenção de melhores perfis genéticos e, por fim, salientar a importância da criação de um protocolo padronizado que garante a recolha das melhores amostras possíveis em casos de agressão sexual, consequentemente resultando em menos casos de vitimização secundária.

A amostra foi composta por 14 casais heterossexuais que simularam amostras de agressões sexuais esfregando no membro superior da companheira uma camada de sémen do companheiro e fazendo a colheita das amostras recorrendo a quatro técnicas: usando uma única zaragatoa (1) friccionando apenas uma das faces, (2) rodando a zaragatoa, sem incluir o ápice, (3) rodando a zaragatoa, incluindo o ápice e utilizando a “*double swabbing technique*”.

As amostras foram inicialmente analisadas recorrendo a um *kit* para marcadores autossómicos e as técnicas foram posteriormente avaliadas quanto à quantidade de DNA obtido em cada uma delas e à qualidade dos perfis genéticos nos quais as suas amostras resultavam. A investigação concluiu que a “*double swabbing technique*” permitiu obter os melhores perfis genéticos masculinos, enquanto que rodando a zaragatoa, incluindo o ápice, permitiu a colheita da maior quantidade de DNA. De igual forma, percebeu-se que a utilização de uma destas duas técnicas permite a colheita de uma quantidade de DNA significativamente superior às outras duas técnicas estudadas.

A presente investigação apresenta uma primeira abordagem à criação de um protocolo padronizado, avançando que a utilização da “*double swabbing technique*” ou garantindo que toda a zaragatoa é coberta de vestígio, beneficia a análise tanto no que diz respeito à quantidade de DNA obtido, como na qualidade dos perfis genéticos.

Em casos de agressões sexuais, em que as amostras obtidas através do exame médico forense contêm geralmente pouca quantidade de DNA, é essencial que o método de recolha seja tão eficiente quanto possível, de modo a obter a maior quantidade de DNA possível. Considerando este cenário, os resultados serão mais confiáveis, podendo ditar uma boa contribuição da genética forense na resolução do crime.

Palavras Chave: Agressão sexual, *double swabbing technique*, Genética Forense, zaragatoas

## ABSTRACT

Sexual assaults are one of the most prevalent crimes in our society, mainly perpetrated against women. Thus, semen detection on the victim and/or at the crime scene is essential in order to prove sexual contact and identify the perpetrator through DNA analysis.

This research aims to compare the three variants of the "classic" method and the "double swabbing technique", in order to assess which obtains better genetic profiles and, finally, to emphasize the importance of creating a standardized protocol that ensures the collection of the best possible samples in sexual assault cases, thus resulting in fewer cases of secondary victimization.

The sample was composed of 14 heterosexual couples who simulated sexual assault samples by rubbing a layer of semen on the companions upper limb and collecting a sample using four different techniques: using a single swab (1) rubbing only one side, (2) rolling the swab, not including the tip, (3) rolling the swab, including the tip and by using the "double swabbing technique."

The samples were initially analyzed using a *kit* for autosomal markers and the techniques were subsequently evaluated for the amount of DNA obtained in each of them and the quality of genetic profiles in which they resulted. The investigation concluded that the "double swabbing technique" resulted in the best possible male genetic profiles, while rotating the swab, including the tip allowed the harvest of a greater amount of DNA. Similarly, we observed that the use of these two techniques allows the collection of significantly greater quantity of DNA than the other two techniques studied.

The present investigation provides a first approach to establish a standardized protocol, advancing the use of the "double swabbing technique" or ensuring that the whole swab is covered in evidence, benefits the analysis, both with regard to the amount of DNA obtained as the quality of genetic profiles.

In cases of sexual assaults where the samples obtained from the forensic medical examination generally contain small amounts of DNA, it is essential that the method of collection is as efficient as possible, so as to obtain the largest possible amount of DNA. Considering this scenario, the results are more reliable and can dictate a good forensic genetic contribution in solving the crime.

Key-Words: double swabbing technique, Forensic Genetics, Sexual Assault, swabs

# Índice

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>AGRESSÃO SEXUAL: BREVE REVISÃO</b>	<b>17</b>
<b>ANÁLISE DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO HUMANA</b>	<b>18</b>
EXTRAÇÃO DO DNA	19
QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR PCR EM TEMPO REAL	19
AMPLIFICAÇÃO POR PCR	20
SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR ELETROFORESE	21
<b>FATORES LIMITANTES DA ANÁLISE DE GENÉTICA FORENSE: EFEITOS ESTOCÁSTICOS</b>	<b>21</b>
DESEQUILÍBRIO DOS PICOS	22
STUTTER	22
ALLELE DROP-OUT	23
ALLELE DROP-IN	23
<b>ANÁLISE DE AMOSTRAS COM BAIXA QUANTIDADE DE DNA</b>	<b>23</b>
<b>COLHEITA DE VESTÍGIOS BIOLÓGICOS: O USO DA ZARAGATOA</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>26</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>AMOSTRAGEM</b>	<b>27</b>
EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO DE <i>CHELEX</i> <sup>®</sup>	28
QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	30
AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR	31
ELETROFORESE CAPILAR COM <i>GENETIC ANALYZER 3500 (AB)</i> COM RECURSO AO SOFTWARE <i>GENEMAPPER</i> <sup>®</sup> <i>ID-X v1.4</i> .	33
<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>48</b>



## Lista de Tabelas

<b>Tabela I</b> Técnicas de utilização de zaragatoas e alínea correspondente .....	28
<b>Tabela II</b> Método de preparação dos standards para a quantificação em tempo real.....	30
<b>Tabela III</b> Concentração total de DNA autossómico e do cromossoma Y e consequente volume de amostra adicionado à reação de amplificação.....	32
<b>Tabela IV</b> Análise da qualidade dos perfis obtidos das amostras através do Teste não-paramétrico de Wilcoxon com o software SPSS. Valores a vermelho representam os valores significativos.....	37
<b>Tabela V</b> Análise dos resultados da quantificação das amostras através do Teste não-paramétrico de Wilcoxon com o software SPSS. Valores a vermelho representam os valores significativos.....	40
<b>Tabela VI</b> Resultados da quantificação em tempo real.....	48

## Lista de Figuras

<i>Fig 1. Exemplo de perfil genético completo após amplificação com AmpF<sup>®</sup> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit</i>	21
<i>Fig 2. Exemplo de desequilíbrio dos picos</i>	22
<i>Fig 3. Exemplo de elevado stutter</i>	22
<i>Fig 4. Exemplo de Allele drop-out</i>	23
<i>Fig 5. Exemplo de Allele drop-in</i>	23
<i>Fig 6. Triple-Head CEP<sup>®</sup> Swab</i>	27
<i>Fig 7. Esquema de realização da zaragatoa bucal</i>	27
<i>Fig 8. Corte da zaragatoa na fase inicial da extração</i>	29
<i>Fig 9. Porção de zaragatoa cortada para análise</i>	29
<i>Fig 10. Collection Swab Viscose (BIOPLASLAB<sup>®</sup>)</i>	29
<i>Fig 11. Termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700</i>	33
<i>Fig 12. Exemplos de amostras cujas zaragatoas apresentam aparente crescimento de fungos</i>	34

## Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Perfis masculinos obtidos da análise dos diferentes métodos de colheita .....	31
<b>Gráfico 2.</b> Distribuição das técnicas pelos tipos de perfis obtidos da análise .....	32
<b>Gráfico 3.</b> Distribuição dos tipos de perfis obtidos pelas diferentes técnicas estudadas .....	33
<b>Gráfico 4.</b> Número médio de marcadores autossómicos amplificados em cada amostra, por técnica estudada. * representa os grupos para os quais foram encontradas diferenças significativas ( $B \ll A$ e $D$ ) .....	34
<b>Gráfico 5.</b> Perfis genéticos masculinos amplificados com AmpF $\ell$ STR $^{\text{®}}$ Yfiler $^{\text{®}}$ Plus PCR Amplification Kit .....	35
<b>Gráfico 6.</b> Perfis genéticos masculinos amplificados com AmpF $\ell$ STR $^{\text{®}}$ Yfiler $^{\text{®}}$ Plus PCR Amplification Kit distribuídos por técnica estudada .....	35
<b>Gráfico 7.</b> Média da quantidade de DNA autossómico total e do cromossoma Y obtido por cada técnica estudada. * representa os grupos para os quais foram encontradas diferenças significativas ( $A$ e $B \ll D$ para a quantidade de DNA autossómico e $A$ e $B \ll C$ e $D$ para a quantidade de DNA do cromossoma Y) .....	37

## Lista de Abreviaturas

OMS – Organização Mundial de Saúde

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

APAV – Associação Portuguesa de Apoio à Vítima

AS – Agressão Sexual

EMF – Exame Médico Forense

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

qPCR – Real-time *Polymerase Chain Reaction*

STR – *Short Tandem Repeats*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorfism*

LT-DNA – Low-template DNA

dNTP - Desoxinucleótidos

trifosfatados UV – Ultravioleta

μl – Microlitro

rpm – Rotações por minuto

SA – DNA autossómico total



# INTRODUÇÃO

## Agressão Sexual: Breve revisão

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a violência como sendo “o uso intencional da força física ou do poder, real ou em ameaça, contra si próprio, contra outra pessoa, ou contra um grupo ou uma comunidade, que resulte ou tenha grande possibilidade de resultar em lesão, morte, dano psicológico, deficiência de desenvolvimento ou privação”. A violência sexual, definida pela OMS como “qualquer ato sexual, tentativa de obter um ato sexual, comentários ou investidas sexuais indesejados, ou atos direcionados ao tráfico sexual ou, de alguma forma, voltados contra a sexualidade de uma pessoa usando a coação, praticados por qualquer pessoa independentemente de sua relação com a vítima, em qualquer cenário, inclusive em casa e no trabalho, mas não limitado a eles”, constitui grave violação dos direitos humanos e é atualmente um grave problema de saúde pública (Cabral, 2011; Krug et al., 2002), afetando milhões de pessoas em todo o mundo (Magalhaes et al., 2015).

A legislação penal portuguesa contempla diversos tipos de situações de violência sexual na denominada tipificação penal dos crimes contra a liberdade sexual, abordada nas secções 1 e 2 do capítulo V do Código Penal, onde se inclui a coação sexual, a violação, o abuso sexual de pessoa incapaz de resistência, o abuso sexual de pessoa internada, a importunação sexual, o abuso sexual de crianças, o abuso sexual de menores dependentes e os atos sexuais com adolescentes (Cabral, 2011; Mesquita, 2009).

A obtenção de taxas de prevalência de crimes desta natureza é dificultada uma vez que os casos que são reportados às autoridades representam apenas uma pequena fração das transgressões que realmente ocorrem. Este tipo de crime é largamente subestimado devido a vários fatores, como os fatores psicológicos associados (e.g. vergonha, humilhação, medo) e a idade da vítima, intimidação por parte do agressor ou pela proximidade relacional com a vítima, ou a vitimização secundária (associada a todo o stress que o processo judicial origina) (Cabral, 2011; Vieira, 2010). Também, a natureza violenta deste tipo de crime, que envolve frequentemente força física e ameaças, suscita medo e tem mais impacto uma vez que as vítimas pertencem principalmente a grupos mais vulneráveis como crianças, mulheres ou pessoas incapacitadas (Vieira, 2010). Os crimes sexuais afetam, na sua maioria indivíduos do sexo feminino, estimando-se que, a nível mundial, uma em cada cinco mulheres será vítima de agressão ou de tentativa de agressão sexual durante a sua vida (Cybulska and Forster, 2010). Em Portugal, o relatório anual da Associação Portuguesa de Apoio à Vítima (APAV) de 2015 reporta 255 casos de crime de natureza sexual, sendo a

vítima do sexo feminino em 82.1% dos casos (APAV, 2015).

Devido ao contexto íntimo em que ocorrem, as testemunhas oculares de agressões sexuais (AS), são escassas e os tribunais reconhecem a falta de imparcialidade/fidedignidade nos seus testemunhos. É por isso reconhecida elevada importância às evidências encontradas no local do crime e/ou na vítima, pois direta ou circunstancialmente, podem, de forma independente e objetiva, permitir estabelecer uma ligação entre o suspeito e a vítima/local do crime, descredibilizar álbis, exonerar um inocente ou simplesmente proporcionar mais informação relevante para a investigação (Catalin et al., n.d.).

Em investigações de AS, a realização do exame médico forense (EMF) à alegada vítima é um procedimento fundamental e incontornável na produção de prova da agressão (Magalhães and Vieira, 2013). Esta perícia permite a recolha de prova, desde a documentação de lesões compatíveis com a hipótese de agressão sexual até à recolha de vestígios biológicos, para posteriores análises. Em Portugal, a perícia médico legal é assegurada por um perito do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., salvo impossibilidade de a realizar no período de 72h após o último contacto sexual, estabelecido de acordo com a legislação aplicável, delegando-se então a tarefa a um médico do local onde a vítima se dirigiu para efetuar o exame (e.g. Hospital). O objetivo deste exame é recolher o máximo de informação útil, que permita corroborar ou contestar os acontecimentos relatados pela vítima e/ou pelo suspeito.

### **Análise de DNA para identificação humana**

A identificação humana tem tido um papel importante na resolução de muitas questões legais. Para tal, a grande variabilidade de polimorfismos de DNA pode suportar indícios de que uma determinada amostra colhida no local do crime e a de um suspeito, têm a mesma origem (Evidence, 2000). A análise de DNA tem-se tornado particularmente importante na resolução de casos criminais envolvendo agressões sexuais (Bozzo et al., 2009), pela relativa facilidade com que o perpetrador pode deixar os seus vestígios, quer seja pela transferência de células epiteliais para objetos, quer de saliva (e.g. morder ou lambe a vítima) (Williams et al., 2015), ou pela libertação de esperma numa cavidade corporal e/ou numa região corporal externa da vítima.

Cerca de 99.7% da sequência de DNA é partilhada por todos os seres humanos, pelo que apenas cerca de 0.3% do genoma humano tem variações que permitem distinguir os indivíduos (Butler, 2009). Estas variações (polimorfismos) podem ser essencialmente de dois tipos: (1) Polimorfismos de sequência ou (2) Polimorfismos de comprimento. A nível de identificação humana para fins forenses, são estudados múltiplos polimorfismos de

comprimento, pois têm elevado poder de discriminação individual, em marcadores ou *loci* que devem exibir a maior variabilidade possível, em regiões não-codificantes do genoma humano.

## Extração do DNA

Até ser possível a obtenção de um perfil genético, uma amostra biológica segue um percurso laboratorial, que se inicia no processo de extração. Este passo é dos mais importantes para a análise laboratorial, uma vez que se isolam as moléculas de DNA dos outros componentes celulares, e se obtém a amostra que servirá de base para o resto da análise (Bogas, 2013). Existem vários métodos para efetuar a extração: o orgânico (fenol-clorofórmio), os que utilizam *kits* comerciais (e.g. *PrepFiler<sup>®</sup> Forensic DNA Extraction kit*) e o que utiliza uma resina quelante, o Chelex. Esta resina, simples e económica, permite a obtenção de um extrato com quantidade razoável de DNA em pouco tempo, sendo por isso bastante utilizada.

## Quantificação do DNA por PCR em tempo real

Existem também diversas metodologias que permitem determinar a quantidade de DNA disponível numa amostra. Este passo é essencial para otimização da fase seguinte da análise. A quantificação por PCR em tempo real (qPCR) permite avaliar tanto a quantidade como a qualidade de DNA de uma amostra, pelo que é um método de eleição para o qual existem já vários *kits* comercializados. Este método baseia-se na presença de uma sonda, na qual existe um fluorocromo ligado a uma extremidade e um *quencher* (molécula que absorve a energia emitida pelo fluorocromo) a outra. Na presença de DNA amplificável, a sonda hibridiza com a sequência complementar, localizada entre os *primers forward* e *reverse* da região que se pretende amplificar, e na presença da *Taq* DNA polimerase o fragmento é amplificado. Quando isto acontece, a *Taq* DNA polimerase, com atividade também de exonuclease, degrada a sonda e como consequência ocorre o afastamento do fluorocromo e do *quencher*, permitindo então a emissão de fluorescência quando excitado. A fluorescência emitida será tanto maior quanto maior for a quantidade de DNA presente, e esta será obtida por comparação com uma curva padrão (obtida analisando amostras com concentrações conhecidas).

## Amplificação por PCR

### STR

As metodologias de identificação individual evoluíram ao longo dos anos, desde a utilização dos *Restriction Fragment Length Polimorfism* (RFLPs) até à atual utilização de metodologias baseadas na *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A reação de amplificação pela PCR é um processo enzimático, na qual uma região específica de DNA é replicada inúmeras vezes e que se baseia essencialmente em ciclos de aquecimento e arrefecimento das amostras. Atualmente, os marcadores amplificados correspondem a regiões de *Short Tandem Repeats* (STR), que são unidades de repetição com 2 a 7 pares de bases, designados de acordo com o número de nucleótidos da repetição base. Podem variar em tamanho (e.g. repetições AC (Dinucleótidos), repetições CCG (Trinucleótidos)), em número de repetições (e.g. Marcador TH01 3-14 repetições) e também no rigor com que estão em conformidade com o padrão de repetição (e.g. *Simple repeats* (AGAT), *Compound repeats* (AAGG/TAGG), *Complex repeats* (TCTA/TCTG)). Este tipo de marcador é facilmente amplificável pela PCR e é altamente sensível, o que permite a sua análise mesmo em casos de amostras com pouca quantidade/qualidade de DNA (Butler, 2009).

Atualmente existem vários *kits* comerciais para amplificação em *multiplex* de vários marcadores, desde os *kits* mais simples, como o *AmpF<sub>l</sub> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit*, contendo 8 marcadores autossómicos e o marcador determinante do género – amelogenina, até aos mais recentes como o PowerPlex<sup>®</sup> Fusion System (Promega Corporation) e o GlobalFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit (Applied Biosystems (AB)), que contemplam um total de 23 e 21 marcadores autossómicos, respetivamente, 3 e 2 marcadores específicos do cromossoma Y e o marcador da amelogenina. Estes *kits* englobam uma série de marcadores essencialmente autossómicos.

Embora analise um número inferior de marcadores, o *AmpF<sub>l</sub> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit* é largamente utilizado no âmbito forense por estar especificamente otimizado para amostras degradadas e/ou contaminadas. Este *kit* utiliza *primers* que flanqueiam muito próximo da região repetitiva, produzindo amplicões ligeiramente mais pequenos que outros *kits*, o que lhe concede uma taxa de sucesso superior na análise de DNA de amostras.

Existem também *kits* específicos para amplificar marcadores do cromossoma Y, mas como este é de herança uniparental paterna, a obtenção de um haplótipo do cromossoma Y apenas nos permite determinar a linhagem paterna, uma vez que todos os indivíduos do sexo masculino da mesma família terão o mesmo haplótipo. Não obstante, o estudo destes marcadores pode ser útil para orientar uma investigação de AS quando não é possível a

obtenção do perfil autossómico do suspeito ou em casos de misturas de material biológico masculino e feminino, em que o feminino se encontra em maior quantidade.

### Separação dos fragmentos por Eletroforese

No final da amplificação é necessário proceder à separação dos fragmentos, pois o produto final obtido da reação de PCR constitui uma mistura de moléculas de DNA. Esta separação é realizada através da eletroforese, que pode ser na forma de gel ou capilar. Neste processo há criação de um campo elétrico no qual o DNA, carregado negativamente pelos grupos fosfato na sua constituição, migra do polo carregado negativamente (cátodo) para o carregado positivamente (ânodo). Os fragmentos maiores terão maior dificuldade a atravessar o campo elétrico e migrarão menos, ficando então os fragmentos separados por tamanho. Os resultados obtidos sob a forma de eletroferograma (Fig. 1) são posteriormente inseridos num *software* (*GeneMapper® ID-X v1.4*) que permite efetuar a identificação dos fragmentos por comparação a um *ladder* alélico, constituindo por fim, o perfil genético. Este pode definir-se como “o conjunto de características hereditárias de um indivíduo para um determinado número de marcadores genéticos que pode ser detetada em qualquer amostra biológica desse mesmo indivíduo” (Bogas, 2013).

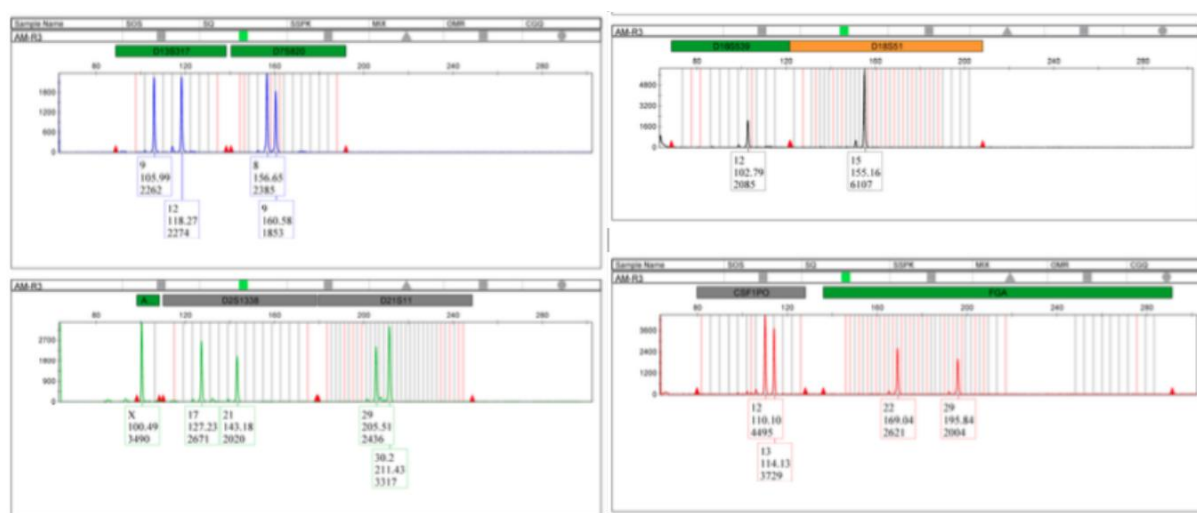


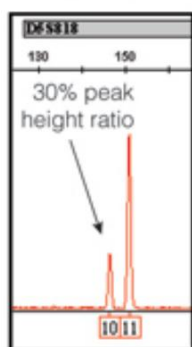
Fig. 1 - Exemplo de perfil genético completo após amplificação com *Am pFLS TR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit*.

### Fatores limitantes da análise de Genética Forense: Efeitos estocásticos

A quantidade e a qualidade de DNA disponível na amostra são fatores determinantes para o sucesso da análise laboratorial em casos de AS. Por vezes as amostras enviadas para as perícias de genética forense possuem exíguas quantidades de DNA. Como possíveis causas, podem estar a denúncia tardia ou as medidas higiénicas efetuadas pela vítima. Estas amostras podem também apresentar padrões de mistura, que por si só são de

difícil interpretação, estar degradadas ou inibidas ou podem até apresentar uma combinação de todos estes fatores (Adamowicz et al., 2014). Assim sendo, estas características tornam a obtenção de resultados um processo moroso e podem até resultar em casos de insucesso da análise pois resultam em eventos de amplificação estocástica, o que impede uma correta leitura do perfil genético. Os efeitos estocásticos manifestam-se como uma flutuação de resultados entre análises replicadas, isto é, a amplificação do mesmo extracto de DNA duas vezes pode resultar na detecção de diferentes alelos para um mesmo *locus* (Butler and Hill, 2010). Os efeitos dominantes neste tipo de amostras são o desequilíbrio dos picos, aumento do *stutter*, *allele drop-out* e a contaminação, também designada de *allele drop-in*.

### Desequilíbrio dos picos



O desequilíbrio dos picos resulta da amplificação preferencial de um dos alelos do marcador, para o qual o indivíduo é heterozigótico, alterando a área do pico e podendo confundir-se um dos alelos com, por exemplo, um *stutter* (Fig. 2).

Fig. 2 - Exemplo de desequilíbrio dos picos.

### Stutter

Presume-se que o *stutter* resulte de um deslizamento da DNA polimerase durante o processo de PCR, produzindo cópias de tamanho errado por deleção ou eventualmente inserção de uma unidade de repetição. Os picos deste artefacto surgem então normalmente uma unidade de repetição antes do “verdadeiro” alelo, podendo no entanto aparecer uma unidade de repetição depois, tendo geralmente um tamanho inferior a 15% do tamanho do alelo principal (Fig. 3).

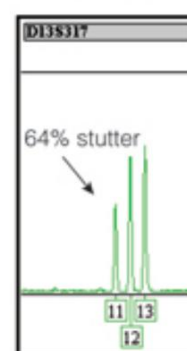


Fig. 3 - Exemplo de elevado *stutter*.

### Allele drop-out

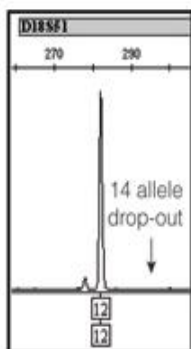


Fig. 4 - Exemplo de *Allele drop-out*.

### Allele drop-in

*Allele drop-in* consiste em picos que não constituem artefactos mas que também não representam alelos do perfil do suspeito e/ou vítima. Este tipo de artefacto é muito comum em amostras com pouca quantidade de DNA - low-template DNA (LT-DNA) (Fig. 5).

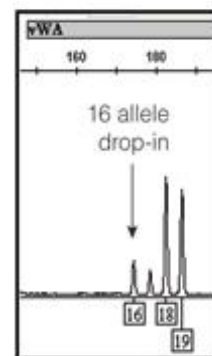


Fig. 5 - Exemplo de *Allele drop-in*.

### Análise de amostras com baixa quantidade de DNA

Existem vários trabalhos publicados relativos a amostras que possuam pouco DNA, havendo métodos que sugerem desde a optimização das técnicas de extração (Allard et al., 2007; Bogas, 2013) até aos métodos que aumentam a sensibilidade da PCR e, consequentemente, o número de alelos detetados. Entre eles encontram-se o aumento do número de ciclos de PCR (Weiler et al., 2012), que visa compensar a baixa quantidade de DNA molde, ao permitir um maior intervalo para que ocorra o *annealing* e a extensão, a adição de Taq Polimerase em excesso, de modo a poderem ser amplificados mais fragmentos e a purificação pós-PCR, que tem por objetivo remover do amplificado os *primers*, dNTPs e sais em excesso, concentrando o DNA amplificado na solução (Adamowicz et al., 2014). No entanto, estes métodos, além de dispendiosos, podem também resultar em artefactos biológicos, que podem induzir em erro aquando a interpretação, como, por exemplo, confundindo um elevado *stutter* com um verdadeiro alelo ou considerando um sujeito homozigótico/heterozigótico para um determinado marcador devido a um *allele drop-out/in*, respetivamente. Assim, os autores sugerem que talvez o



meio mais fiável para a obtenção de perfis de DNA mais completos, seja melhorar as técnicas de recolha, de modo a aumentar a quantidade de DNA para analisar. A correta colheita, acondicionamento e preservação dos vestígios recolhidos em casos de investigações de AS, bem como a garantia da cadeia de custódia dos vestígios constituem então uma parte essencial do processo, para que se obtenham resultados fidedignos, legalmente aceites (Magalhães and Vieira, 2013).

Nos casos que envolvem a suspeita de AS, um dos principais propósitos da colheita de evidências biológicas passa pela detecção de sémen, indicando a ocorrência de contacto sexual (Joki-Erkila et al., 2014). Assim, entre as evidências forenses mais relevantes neste tipo de perícias, encontra-se o esfregaço vaginal colhido durante o EMF (Garvin et al., 2012). O estudo de Bozzo et al. (2009), analisou 300 casos de agressões sexuais e permitiu concluir que para além do esfregaço vaginal, também o anal e a análise das cuecas da vítima se mostram úteis para recolher DNA do agressor.

### Colheita de vestígios biológicos: O uso da zaragatoa

Relativamente à colheita de vestígios biológicos durante o EMF em alegadas vítimas de AS, este será realizado após uma cuidadosa inspeção visual da área corporal afetada, da caracterização, descrição e fotodocumentação das mesmas. A correta realização do EMF é imperativa para evitar subsequente vitimização secundária.

Posteriormente procede-se, então, à colheita de vestígios nas áreas anteriormente observadas, passíveis de conter algum vestígio biológico pertencente ao perpetrador. O uso da zaragatoa para colheita de vestígios biológicos é o procedimento padrão nos laboratórios forenses (Newton, 2013). Este material é relativamente económico, de simples uso e transporte, e possibilita a recolha de vários tipos de materiais biológicos (e.g. sangue, saliva, sémen) (Verdon et al., 2014).

A eficiência de uma zaragatoa é influenciada por vários fatores, nomeadamente o material de que é feita a ponta da zaragatoa bem como a sua grossura/comprimento, a sua articulação com a pega da zaragatoa, entre outros. Entre os vários materiais que podem constituir a ponta da zaragatoa (e.g. algodão, nylon), a de algodão é a mais vulgarmente utilizada no EMF de vítimas de AS (Gingras et al., 2009).

Vários estudos debruçam-se sobre os materiais constituintes das zaragatoas, no sentido de aferir qual permite obter melhores resultados (Benschop et al., 2010; Marshall et al., 2014). No entanto, existem também diversas técnicas associadas ao uso da zaragatoa que podem igualmente influenciar o resultado final ficando estas, geralmente, ao critério do perito que executa a perícia (Magalhães et al., 2013). O método “clássico”, isto é, a



utilização de apenas uma zaragatoa, é até hoje o método mais utilizado na recolha de vestígios biológicos. Williams et al. (2015) define este método clássico como sendo a passagem de uma única zaragatoa no vestígio/local em causa, em movimentos circulares, rodando e assegurando que toda a zaragatoa entra em contacto com o vestígio, por forma a recolher o máximo possível de DNA. Na prática corrente, esta técnica é realizada (1) friccionando apenas uma das faces da zaragatoa, (2) rodando a zaragatoa a toda a volta, mas sem incluir o ápice ou (3) rodando a zaragatoa e incluindo o ápice. Do ponto de vista laboratorial, as primeiras duas técnicas de recolha encontram-se em desvantagem, pois ao proceder à extração do DNA da zaragatoa, apenas uma pequena porção é cortada para efetuar a análise. Não ficando toda a zaragatoa coberta pelo vestígio, é possível que a amostra efetivamente analisada não contenha qualquer vestígio ou contenha uma quantidade que não otimizará a análise.

Além das anteriormente referidas, foi descrito por Sweet et al. (1997) uma nova metodologia para utilizar a zaragatoa, designada de “*double swabbing technique*”. Esta técnica consiste na utilização de duas zaragatoas em vez de apenas uma. A primeira, humedecida, é friccionada no local onde se pretende recolher o vestígio e após não mais de dez segundos utiliza-se a segunda zaragatoa, seca, no mesmo local. No fim, as duas zaragatoas são extraídas em conjunto para realizar a análise. Estudos com esta técnica têm demonstrado melhores resultados (Pang and Cheung, 2007), o que pode ser explicado pelo facto da primeira zaragatoa hidratar e soltar as células presentes nos fluídos secos fazendo com que as células humedecidas sejam recolhidas pela zaragatoa. No seguimento, a zaragatoa seca recolhe as células hidratadas mais facilmente, aumentando o número de células recolhidas (Pang and Cheung, 2007; Williams et al., 2015).

Apesar de já comprovada a eficiência superior da *double swabbing technique* na recolha de células epiteliais e em vestígios salivares, a maioria dos peritos continua a dar preferência à utilização de uma única zaragatoa, previamente humedecida (Williams et al., 2015), podendo ser explicado por questões monetárias e/ou práticas (Verdon et al., 2014).

Nos casos forenses, em que a qualidade e/ou quantidade de DNA disponível é diminuta, é essencial que o método de recolha seja o mais exaustivo e eficiente possível. Embora alguns protocolos e *guidelines* já tenham sido publicados, poucos países adoptaram oficialmente *guidelines* para o manuseamento das amostras, nomeadamente em casos de AS. Mesmo nos países que adoptaram protocolos publicados, estes muitas vezes variam entre localidades, existindo a necessidade de um protocolo padronizado, que todos devem utilizar (Magalhaes et al., 2015).

## OBJETIVO

Assim, o presente estudo pretende estudar as duas técnicas de utilização das zaragatoas supra referidas, incluindo as três variantes do método “clássico”, no sentido de aferir qual apresenta maior eficácia na recolha de sémen e na obtenção de perfis genéticos masculinos completos. Pretende também complementar com sugestões para estudos futuros que, de igual forma, possam ser úteis para auxiliar nas investigações de AS, permitindo maximizar a eficiência das análises efetuadas, com o objetivo final de evitar consequentes casos de vitimização secundária.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## Amostragem

A presente investigação reúne uma amostra de 14 casais heterossexuais, caucasianos e de idades compreendidas entre os 22 e os 42 anos. Os participantes, voluntários, constituem uma amostra não probabilística por conveniência e após consentimento informado procederam à colheita das amostras.

O material biológico foi recolhido entre Dezembro de 2015 e Abril de 2016, através de um *kit* entregue aos participantes para o efeito, que continha duas zaragatoas bucais (Triple-Head CEP<sup>®</sup> Swab, FITZCO) (Fig. 6), seis zaragatoas de algodão (Collection Swab Viscose, BIOPLASLAB<sup>®</sup>) e uma embalagem de 5 ml de solução de Cloreto de Sódio a 0.9% (soro fisiológico). O *kit* incluía também uma folha de informação ao participante, um guião detalhado de como proceder à colheita das amostras e uma folha de consentimento informado, aprovada pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João, Porto.

Inicialmente foi pedido aos casais que utilizassem as zaragatoas bucais para colher as amostras de referência (Fig. 7). Estas amostras constituem aquelas colhidas de forma ideal, contendo quantidade de DNA suficiente para obter os perfis genéticos de cada um dos participantes na sua integridade. As amostras “problema”, aquelas colhidas de forma a simular uma AS, foram posteriormente comparadas às de referência, de modo a perceber quais os alelos pertencentes a cada um dos membros do casal e identificar possíveis efeitos estocásticos.

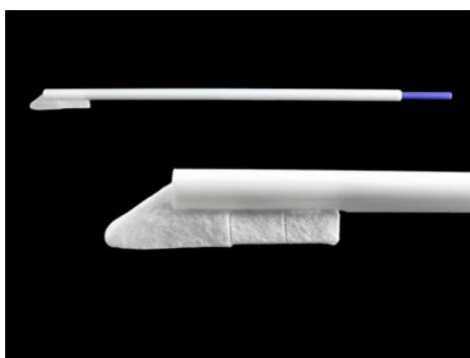


Fig. 6 - Triple-Head CEP<sup>®</sup> Swab.



Fig. 7 - Esquema de realização da zaragatoa bucal.

Com o objetivo de estudar os diferentes métodos de recolha de sémen instruiu-se os casais para utilizar uma das zaragatoas de algodão, incluída no *kit* para esse efeito, e espalhar uma fina camada de sémen do seu parceiro no antebraço da parceira por cada um dos métodos a estudar (Tabela I).

Tabela 1. – Técnicas de utilização de zaragatoas e alínea correspondente.

Alínea	Descrição
A.	Friccionar apenas uma das faces da zaragatoa na mancha
B.	Rodar a zaragatoa na mancha, sem incluir o ápice
C.	Rodar a zaragatoa na mancha, incluindo o ápice
D.	<i>Double Swabbing technique</i>

Foi pedido aos participantes que humedecessem todas as zaragatoas de algodão utilizadas, à exceção da alínea D. A primeira alínea requeria que friccionassem apenas uma das faces da zaragatoa no local. Na alínea B era pedido que rodassem a zaragatoa na mancha, de forma que todas as faces das zaragatoas, exceto o ápice, estivessem em contacto com o vestígio. À semelhança da alínea anterior, a alínea C pedia que rodassem a zaragatoa na mancha, para que todas as suas faces entrassem em contacto com o local, mas incluindo o ápice. A alínea D, referente à *double swabbing technique*, pedia que utilizassem duas zaragatoas de algodão na mesma mancha, sendo que a primeira deveria ser humedecida com o soro fisiológico e rodada na mancha, incluindo o ápice e a segunda deveria ser utilizada seca, e recolhida da mesma forma que a primeira.

Para efeitos de codificação de amostras, as de referência foram organizadas numa lista por casais, por ordem alfabética da companheira, sendo atribuído o número ímpar ao sexo feminino e o par ao sexo masculino. Optou-se por códigos **AM-Rx** (x – número do indivíduo segundo o critério anterior), do AM-R1 ao AM-R28.

Relativamente às amostras “problema”, codificaram-se pelo número do estudo na investigação no qual está incluído (IV). As amostras dos 14 casais foram posteriormente distribuídas aleatoriamente e denominadas de C1 a C14. Por fim, identificou-se o método utilizado para a recolha, pela alínea correspondente (e.g. IVC1A, IVC2B).

### Extração de DNA pelo método de *Chelex*<sup>®</sup>

A metodologia que utiliza *Chelex*<sup>®</sup> para extração de DNA, consiste essencialmente na utilização de uma resina-quelante, em suspensão, que pode ser adicionada diretamente às amostras. É composto por copolímeros de estireno divinilbenzeno que contêm iões iminodiacetato emparelhados que atuam como agentes quelantes, ligando-se a iões metálicos polivalentes, como é o caso do magnésio (Butler, 2009). Na presença deste composto, o magnésio da solução liga-se ao agente quelante, consequentemente inativando as nucleases que degradam o DNA e preservando as suas moléculas.



Fig. 8 - Corte da zaragatoa na fase inicial da extração.



Fig. 9 - Porção de zaragatoa cortada para analisar.

O protocolo de extração pelo método de *Chelex*<sup>®</sup> utilizado nesta investigação foi adaptado no Serviço de Genética e Biologia Forense – Delegação do Norte. Para iniciar o processo, foi cortada uma pequena porção de cada zaragatoa (Fig. 8) para tubos de 2.0 ml (Eppendorf), devidamente identificados (Fig. 9), e adicionou-se 1 ml de água desionizada a cada um. Durante esta fase observou-se a presença de fungos em algumas das amostras colhidas com zaragatoas Invasive sterile EUROTUBO<sup>®</sup> Collection Swab (Deltalab) (Fig. 10), pelo que se adaptou o corte de modo a tentar evitar a sua presença na porção analisada.



Fig. 10 - Collection Swab Viscose (BIOPLASLAB<sup>®</sup>).

Após 30 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram agitados no vórtex durante 5-10 segundos e posteriormente colocados na centrífuga (Thermo Scientific, Heraeus<sup>TM</sup> Pico<sup>TM</sup> 21 Microcentrifuge) a 1200 rpm durante 3 minutos. De seguida, retirou-se cerca de 970µl do sobrenadante e adicionou-se 170µl da solução *Chelex*<sup>®</sup> (homogeneizada) a 5% (previamente preparada, composta pela mistura de 5g de *Chelex*<sup>®</sup> 100 Sodium form (Sigma) e 100 ml de água esterilizada, sem nucleases), a cada um dos microtubos. Os tubos foram colocados no termobloco (Thermomixer<sup>®</sup> Comfort, Eppendorf) a 56°C durante 30 minutos, ao fim do qual se ligou a agitação a 1400 rpm durante 5-10 segundos. Imediatamente após, os tubos foram transferidos para o termobloco QBD1 (Grant) onde

incubaram a 100°C, durante 8 minutos. Por fim, procedeu-se à agitação dos tubos no vórtex (5-10 segundos) e novamente à sua centrifugação a 1200 rpm, durante 3 minutos. Os tubos foram armazenados no congelador a -18°C em suporte devidamente identificado.

## Quantificação por PCR em tempo real

Como referido anteriormente, a quantidade de DNA disponível numa amostra é um fator determinante para o sucesso de uma análise. A fase de amplificação por PCR em *multiplex* depende da quantidade de DNA adicionado à reação, sendo que os *kits* comerciais atuais estão otimizados para *inputs* de DNA entre 0.5 a 2.0 ng. Assim, a quantificação de DNA é fundamental para definir a quantidade de amostra a adicionar à reação de PCR.

A referida quantificação das amostras foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o *Quantifiler<sup>®</sup> Trio DNA Quantification Kit*. Existem várias abordagens ao qPCR, sendo a mais comum aquela que recorre às sondas TaqMan, em que a separação do repórter (ligado à extremidade 5') do *quencher* (ligado à extremidade 3'), resulta num aumento da fluorescência emitida pelo repórter. A fluorescência detetada nas amostras é comparada com a fluorescência de uma reta padrão, obtida pela preparação de amostras de concentração conhecida (*standards*), segundo a Tabela II, permitindo correlacionar a quantidade de DNA molde na amostra.

Tabela II. - Método de preparação dos *standards* para a quantificação em tempo real.

Standards	Concentration (ng/μL)	Example Volumes	Dilution Factor
Standard 1	50.000	10μL (100 ng/μL stock) + 10μL Quantifiler <sup>®</sup> THP dilution buffer	2x
Standard 2	5.000	10μL (Std. 1) + 90μL Quantifiler <sup>®</sup> THP dilution buffer	10x
Standard 3	0.500	10μL (Std. 2) + 90μL Quantifiler <sup>®</sup> THP dilution buffer	10x
Standard 4	0.050	10μL (Std. 3) + 90μL Quantifiler <sup>®</sup> THP dilution buffer	10x
Standard 5	0.005	10μL (Std. 4) + 90μL Quantifiler <sup>®</sup> THP dilution buffer	10x

Adaptado do manual do utilizador de Quantifiler trio

As restantes amostras foram preparadas em placas (*MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems - AB)), adicionando 18µl de *Reaction Mix* (10µl de *Master Mix* + 8µl de *Primer Set*) e 2µl de cada uma das amostras. Incluiu-se sempre um controlo negativo e dois controlos positivos (Controlo 9947A do *AmpF<sup>®</sup> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit* (0.01 ng) e Controlo 007 do *AmpFISTR<sup>®</sup> Yfiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification Kit* (2.0 ng)). No fim do procedimento efetuou-se a selagem da placa com *MicroAmp<sup>™</sup> Optical Adhesive Film* (AB). De seguida, colocou-se a placa na Centrifuge 5810 (Eppendorf) durante 2 minutos a 1000 rpm. Por fim, para que as amostras fossem quantificadas, colocou-se a placa no 7500 Real-Time PCR System (AB) e recorrendo ao *Software HID Real-Time PCR Analysis Software* e à experiência própria para o *Quantifiler<sup>®</sup> Trio DNA Quantification Kit*.

## Amplificação do DNA por PCR

A amplificação foi realizada recorrendo ao *AmpF<sup>®</sup> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit* (AB). Este *kit* permite a amplificação, em *multiplex*, de 8 marcadores autossómicos (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO e FGA) e do marcador determinante do género – amelogenina.

Os materiais e espaço de trabalho para preparar este processo foram descontaminados através da utilização da câmara UV (aura PCR) durante 15-20 minutos. Primeiramente, a *Reaction mix* foi obtida misturando 10µl da *Master mix* e 5µl do *Primer set* num tubo de 2.0 ml (Eppendorf), por cada amostra a analisar. Distribuiu-se 15µl da *Reaction mix* por cada um dos *MicroAmp<sup>®</sup> Reaction tubes* (AB). Adicionou-se até 10µl de cada amostra nos microtubos correspondentes, perfazendo o volume final de 25µl com água esterilizada disponível no *kit*. O volume de amostra foi adicionado segundo a Tabela III, de acordo com os resultados obtidos da qPCR. Para o controlo positivo, juntou-se 10µl do controlo positivo disponibilizado no *kit* num dos microtubos, e para o controlo negativo, adicionou-se 10µl de água esterilizada, incluída também no *kit*.

Tabela III. - Concentração total de DNA autossómico e do cromossoma Y e consequente volume de amostra adicionado à reação de amplificação.

	Alínea A (Friccionar uma das faces)			Alínea B (Rodar sem incluir o ápice)			Alínea C (Rodar incluindo o ápice)			Alínea D (“double swabbing technique”)		
	DNA total	Y	Amp (μl)	DNA total	Y	Amp (μl)	DNA total	Y	Amp (μl)	DNA total	Y	Amp (μl)
<b>C1</b>	0.13	0.07	10	0.23	0.15	7	0.84	0.69	1	0.36	0.33	2
<b>C2</b>	0.04	0.05	10	0.00	0.00	10	0.37	0.43	1	0.34	0.45	2
<b>C3</b>	0.08	0.05	10	0.14	0.08	9	0.39	0.32	2	0.35	0.27	2
<b>C4</b>	0.12	0.11	8	0.22	0.16	6	2.11	1.97	1	1.05	1.08	1
<b>C5</b>	0.06	0.06	10	0.09	0.09	10	0.36	0.38	2	1.37	1.63	1
<b>C6</b>	0.29	0.26	5	0.28	0.24	5	0.82	0.79	1	2.06	1.92	1
<b>C7</b>	0.65	0.48	1	0.13	0.08	10	5.03	3.89	1	0.37	0.29	2
<b>C8</b>	0.50	0.19	8	0.09	0.03	10	1.35	0.31	2	0.84	0.21	2
<b>C9</b>	0.13	0.11	9	0.32	0.25	5	1.55	1.52	1	1.18	1.05	1
<b>C10</b>	0.10	0.04	9	0.04	0.08	10	0.02	0.01	10	0.15	0.05	9
<b>C11</b>	0.28	0.25	5	0.25	0.17	8	0.28	0.21	2	1.89	1.37	1
<b>C12</b>	0.01	0.01	10	0.01	0.00	10	0.02	0.01	10	0.07	0.06	10
<b>C13</b>	0.73	0.55	5	0.09	0.06	10	25.03	3.84	1	4.60	1.26	1
<b>C14</b>	0.22	0.17	7	0.14	0.09	10	0.81	0.24	2	0.61	0.42	1

Para identificação do componente masculino das amostras cuja obtenção de perfil não foi possível através dos marcadores autossómicos, foi utilizado o *AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit*. Este *kit* permite a amplificação, em *multiplex*, de 17 marcadores do cromossoma Y (DYS389I/II, DYS635, DYS627, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS390, DYS438, DYS391, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS437 e DYS449).



À semelhança da preparação das amostras para amplificação dos marcadores autossómicos, os materiais e espaço de trabalho foram descontaminados durante 15-20 min e a *Reaction mix* foi obtida pela mistura, num tubo de 2.0 ml (Eppendorf), de 5µl de *Master mix*, 2.5µl de *Primer Set* e 4.5µl de *nuclease-free water*, por cada amostra a analisar, após o qual se adicionou até 5µl de amostra.

Por fim, colocaram-se as *MicroAmp<sup>®</sup> Caps* (12 caps/strip) (AB) nos tubos e colocaram-se no termociclador *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700* (AB) (Fig. 11), segundo o protocolo disponível no manual do utilizador de cada um dos *kits* utilizados.



Fig. 11 - Termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700.

### Elektroforese Capilar com *Genetic Analyzer 3500* (AB) com recurso ao software *GeneMapper<sup>®</sup> ID-X v1.4*.

Os produtos obtidos após a amplificação constituem uma mistura de moléculas de DNA que requerem um processo de separação para se poderem distinguir – elektroforese.

As amostras foram preparadas juntando uma mistura de 12.5µl ou 9.6µl de Hi-Di<sup>TM</sup> formamida e 0.5µl ou 0.4µl de GeneScan<sup>TM</sup> 500 HD LIZ<sup>®</sup> e GeneScan<sup>TM</sup> 600 HD LIZ<sup>®</sup> size standard com 1µl de amplificado a cada um dos poços da *MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-Well Reaction Plate* (AB), para o *AmpF<sup>®</sup> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>TM</sup> PCR Amplification Kit* e *AmpFISTR<sup>®</sup> Yfiler<sup>®</sup> Plus PCR Amplification Kit*, respetivamente. Foram também preparados 2 ladders alélicos, específicos de cada *kit*, por cada 2 corridas. A genotipagem das amostras foi efetuada por elektroforese capilar, no sequenciador automático *Genetic Analyzer 3500* (AB), e os elektroferogramas obtidos foram analisados utilizando o software *GeneMapper<sup>®</sup> ID-X v1.4*.

## RESULTADOS

Embora a contaminação de amostras por fungos seja um problema largamente reconhecido no âmbito da Genética Forense, a sua observação nas zaragatoas Invasive sterile EUROTUBO<sup>®</sup> Collection Swab (Deltalab), como apresentado na Fig. 12, não revelou ter implicações no estudo em questão, visto que da sua análise foi possível obter perfis genéticos masculinos completos para todas elas.

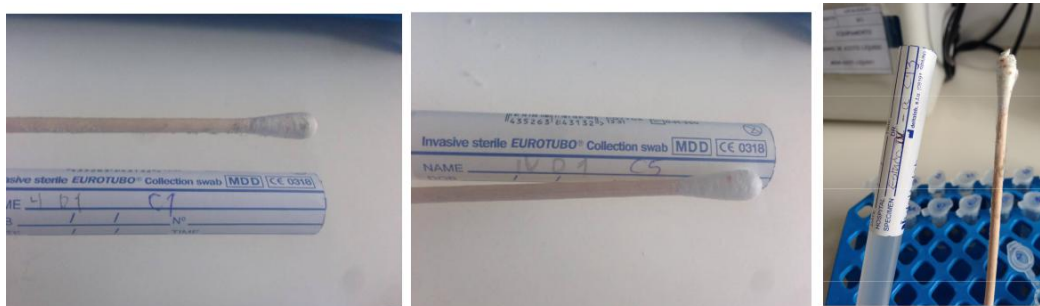


Fig. 12 - Exemplos de amostras cujas zaragatoas apresentam aparente crescimento de fungos.

Avaliando o panorama geral no que diz respeito à qualidade dos perfis obtidos, das 56 amostras analisadas com o *AmpF<sup>®</sup> STR<sup>®</sup> MiniFiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit*, 25 (~45%) permitiram a obtenção de perfis masculinos completos, ou seja, de perfis masculinos exatamente correspondentes aos perfis de referência pedidos aos participantes no início do estudo, 21 (~37%) resultaram em perfis incompletos (entendendo-se como perfil incompleto aquele no qual um ou mais alelos de um ou mais marcadores não tenham amplificado) e em 10 (~18%) não foi possível a obtenção de um perfil masculino (consideraram-se “sem perfil” todas as amostras no qual não houve amplificação de um ou mais alelos em pelo menos 4 marcadores) (Gráfico 1).

### Perfis masculinos obtidos

■ Completos ■ Incompletos ■ Sem Perfil

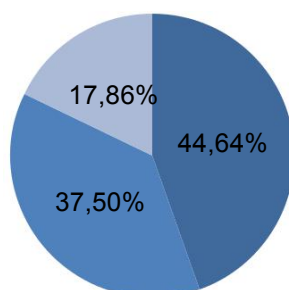


Gráfico 1 - Perfis masculinos obtidos da análise dos diferentes métodos de colheita.

Relativamente aos diferentes métodos de utilização de zaragatoas, o Gráfico 2 permite-nos observar que as alíneas D (“double swabbing technique”) e C (rodando e incluindo o ápice) resultaram em 36.00% (n=9) e 28% (n=7) de perfis masculinos completos, respetivamente, seguindo-se a alínea A (friccionar uma das faces) com 24.00% (n=6) e, por fim, a alínea B (rodar sem incluir o ápice) em que apenas 12.00% (n=3) das amostras resultaram em perfis completos. Quanto à obtenção de perfis incompletos, a sua distribuição foi relativamente equitativa entre as quatro técnicas estudadas, sendo que 23.81% (n=5) das amostras das alíneas A, B e D e 28.57% (n=6) das da alínea C resultaram em perfis incompletos. A distribuição das amostras para as quais não foi possível obtenção de perfil masculino pelas diferentes técnicas estudadas está também representada no Gráfico 2. Das 10 amostras, 60.00% (n=6) pertenciam à alínea B, 30% (n=3) à alínea A e apenas 10.00% (n=1) das amostras da alínea C não resultaram em perfil.

### Distribuição das técnicas pelos tipos de perfis obtidos

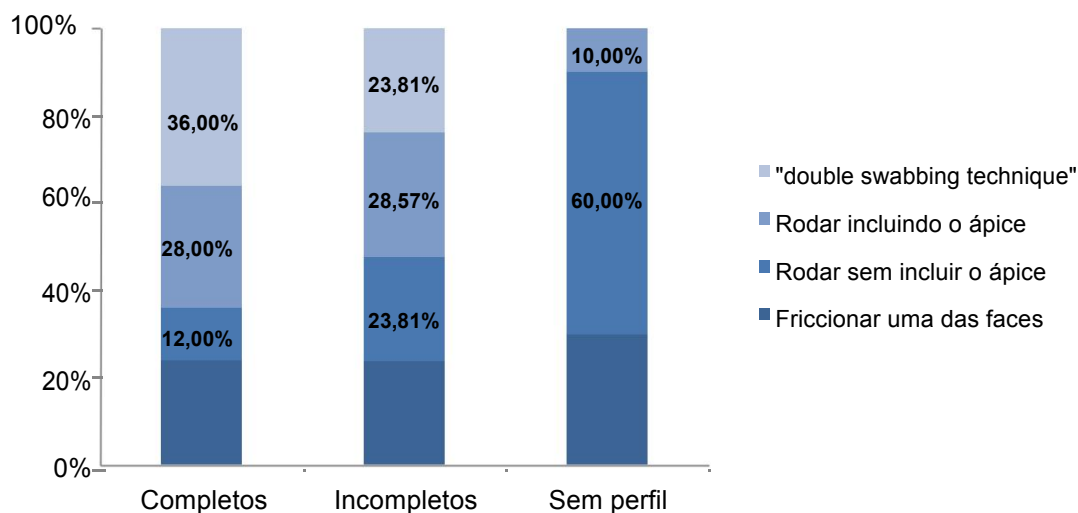


Gráfico 2 - Distribuição das técnicas pelos tipos de perfis obtidos da análise.

O Gráfico 3 revela que das 14 amostras recolhidas friccionando uma das faces (Alínea A), não foi possível obter perfis em 21.43% (n=3) e em 35.71% (n=5) apenas foi possível a obtenção de um perfil incompleto. Com esta técnica 42.86% (n=6) das amostras resultaram em perfis genéticos completos. Relativamente às amostras da alínea B, recolhidas com apenas uma zaragatoa, rodando mas sem incluir o ápice, estas foram aquelas que resultaram na menor percentagem de perfis completos, correspondendo a 21.43% (n=3), e simultaneamente aquelas para as quais se observou o maior número de amostras “sem perfil”, 42.86% (n=6). Este método resultou também em 35.71% (n=5) de perfis genéticos incompletos. Das amostras colhidas com apenas uma zaragatoa, rodando e incluindo o ápice (Alínea C), 50% (n=7) deram origem a perfis masculinos completos, 42.86% (n=6) resultaram em perfis incompletos e apenas para 7.14% (n=1) não se obteve qualquer perfil genético. Observa-se também no Gráfico 3 que 64.29% (n=9) das amostras colhidas recorrendo à “*double swabbing technique*” resultaram em perfis completos e os restantes 35.71% (n=5) correspondem a perfis incompletos, sendo este o método para o qual se obteve a maior percentagem de perfis completos.

### Distribuição dos perfis obtidos pelas técnicas estudadas

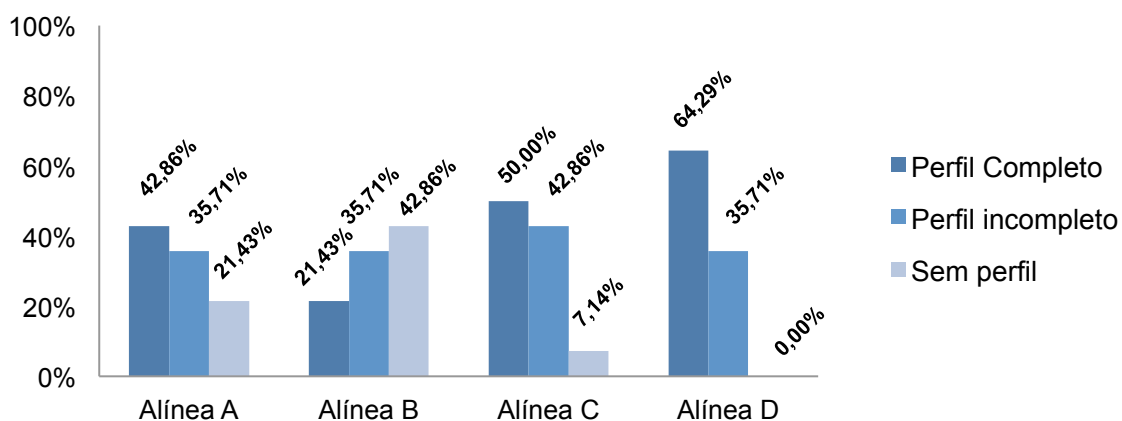


Gráfico 3 - Distribuição dos tipos de perfis obtidos pelas diferentes técnicas estudadas.

A análise estatística da qualidade dos perfis obtidos em cada uma das técnicas foi posteriormente realizada utilizando o teste não-paramétrico de Wilcoxon, após rejeitada a hipótese de distribuição normal, tendo em conta o número de marcadores amplificados para cada casal em cada alínea.

Tabela IV. - Análise da qualidade dos perfis obtidos das amostras através do Teste não-paramétrico de Wilcoxon com o software SPSS. Valores a vermelho representam os valores significativos.

Teste de Wilcoxon		
		Valor de prova (p)
Par 1	Alinea_A - Alinea_B	0.013
Par 2	Alinea_A - Alinea_C	0.836
Par 3	Alinea_A - Alinea_D	0.092
Par 4	Alinea_B - Alinea_C	0.082
Par 5	Alinea_B - Alinea_D	0.006
Par 6	Alinea_C - Alinea_D	0.119

Assim, observa-se no Gráfico 4 que, para a alínea D, correspondente à “double swabbing technique” foram amplificados, em média, 8 dos 8 marcadores amplificados com o kit autossómico utilizado (não se considerou para esta análise o marcador da amelogenina), revelando-se um número significativamente superior ( $p < 0.05$ ) (Tabela IV) relativamente à alínea B, rodando a zaragatoa sem incluir o ápice. As alíneas A, friccionando apenas uma das faces da zaragatoa e C, rodando a zaragatoa e incluindo o ápice permitiram, em média, amplificar 7 e 6 marcadores, respetivamente e, por fim, a alínea B permitiu a amplificação de apenas 5 marcadores dos 8 estudados. A análise estatística revelou também significativa a diferença entre o número de marcadores amplificados entre as alíneas A e B ( $p < 0.05$ ).

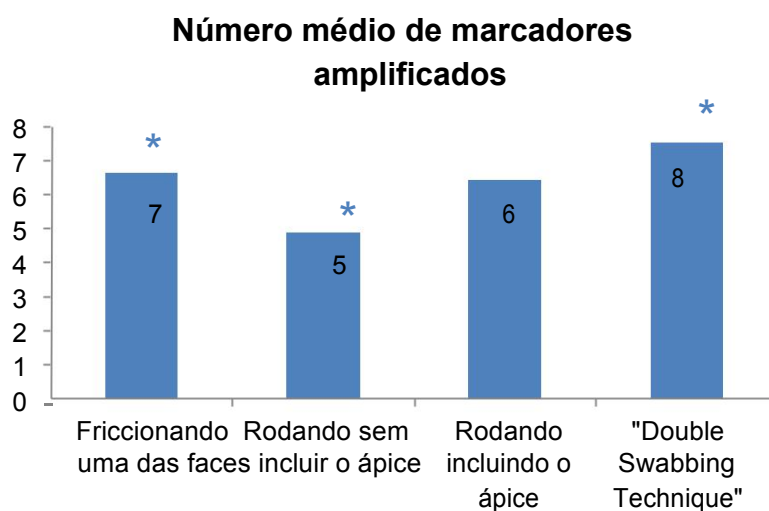


Gráfico 4 - Número médio de marcadores autossómicos amplificados em cada amostra, por técnica estudada.

\* representa os grupos para os quais foram encontradas diferenças significativas ( $B < A$  e  $D$ ).

As 10 amostras para as quais não se obteve qualquer perfil foram posteriormente submetidas a amplificação com o AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit, de modo a

compreender se a análise destas amostras com *kits* específicos do cromossoma Y seria justificável em casos reais, nos quais também não seria possível a obtenção dos perfis autossómicos masculinos, ao beneficiarem significativamente a análise. Apenas se consideraram perfis válidos (com informação suficiente para proceder à identificação de um indivíduo) aqueles cujo haplótipo mínimo foi totalmente amplificado, isto é, quando foram amplificados os 9 marcadores (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b) pertencentes ao núcleo de todos os *kits* Y-STR atualmente utilizados na prática forense (Purps et al., 2014).

Tal como se observa no Gráfico 5, desta análise apenas se obteve um perfil completo do cromossoma Y e um perfil incompleto (no qual apenas falhou um marcador). No entanto, em 80% (n=8) destas amostras continuou a não se obter nenhum perfil.

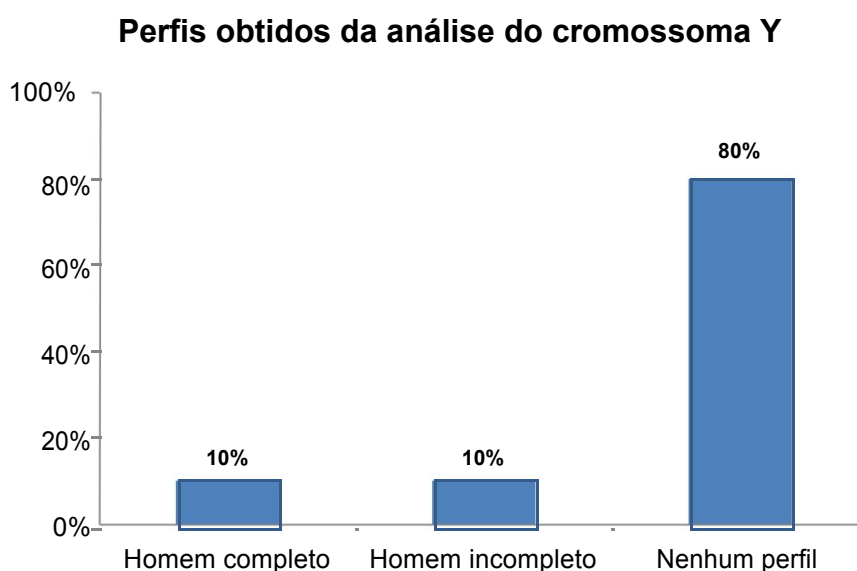


Gráfico 5 - Perfis genéticos masculinos amplificados com AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit.

Das 10 amostras, 3 pertenciam à alínea A, em que 33.33% (n=1) correspondiam a um perfil incompleto e 66.67% (n=2) resultaram em amostras “sem perfil”. Por outro lado, 6 pertenciam à alínea B, em que 16.67% (n=1) originou perfil completo e 83.33% (n=5) não resultaram em perfil. Apenas foi analisada uma amostra da alínea C, a qual não resultou em perfil (Gráfico 6).

### Perfis obtidos por técnica utilizada após análise do cromossoma Y

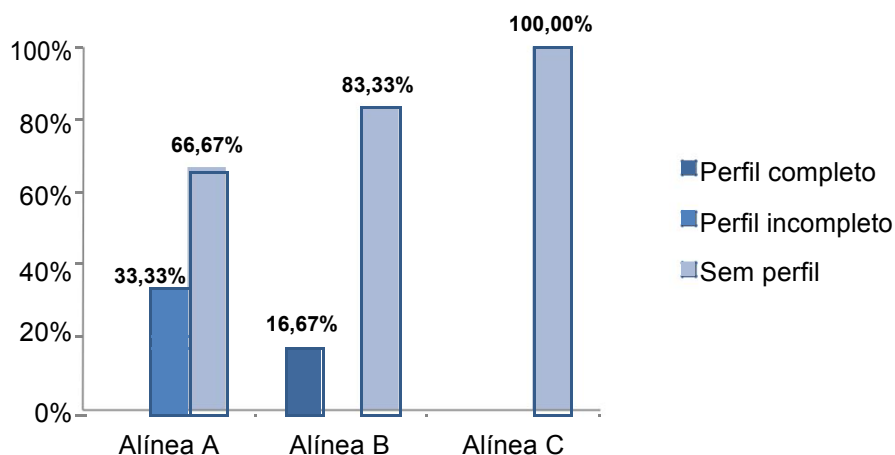


Gráfico 6 - Perfis genéticos masculinos obtidos após amplificação com AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit distribuídos por técnica estudada.

Os resultados da quantificação permitiram a otimização do volume de cada amostra a adicionar à reação de PCR e avaliar a quantidade e qualidade do DNA para cada um dos métodos estudados.

Através da Tabela VI (Anexos) calculou-se a quantidade média de DNA autossómico total (SA) e do cromossoma Y obtido para cada uma das alíneas. Os resultados encontram-se resumidos no Gráfico 7, demonstrando que relativamente à quantidade de DNA total obteve-se uma média de 0.24ng, 0.15ng, 2.78ng e 1.09ng para as alíneas A, B, C e D, respetivamente. Após testada e rejeitada a hipótese de distribuição normal, a análise estatística dos resultados foi realizada através do teste não-paramétrico de Wilcoxon (*Software* SPSS) que revelou que colher as amostras recorrendo à “*double swabbing technique*” ou rodando a zaragatoa, incluindo o ápice, permite obter quantidades de DNA significativamente superiores relativamente aos métodos de friccionar apenas uma das faces e de utilizar apenas uma zaragatoa, rodando mas sem incluir o ápice ( $p < 0.05$ ) (Tabela V).

Tabela V. - Análise dos resultados da quantificação das amostras através do Teste não-paramétrico de Wilcoxon com o software SPSS. Valores a vermelho representam os valores significativos.

		Teste de Wilcoxon	
		Valor de prova ( $p$ )	
		Marcadores Autossómicos	Marcadores do cromossoma Y
Par 1	Alinea_A - Alinea_B	0.463	0.379
Par 2	Alinea_A - Alinea_C	0.002	0.003
Par 3	Alinea_A - Alinea_D	0.003	0.002
Par 4	Alinea_B - Alinea_C	0.002	0.002
Par 5	Alinea_B - Alinea_D	0.001	0.001
Par 6	Alinea_C - Alinea_D	0.397	0.660

O Gráfico 7 revela também diferenças significativas na quantidade do cromossoma Y obtido através da colheita com a “double swabbing technique” e rodando a zaragatoa, incluindo o ápice comparativamente aos métodos de friccionar apenas uma das faces e de utilizar apenas uma zaragatoa, rodando mas sem incluir o ápice ( $p < 0.05$ ) (Tabela V).

### Quantificação em Tempo Real

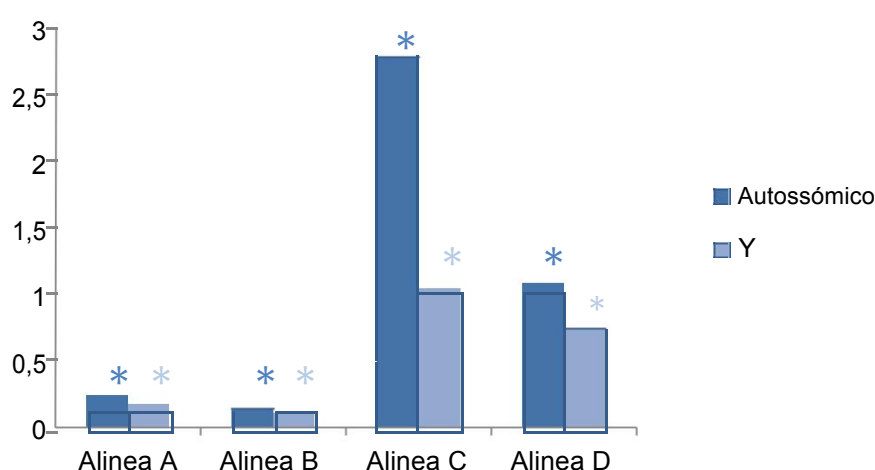


Gráfico 7 - Média da quantidade de DNA autossómico total e do cromossoma Y obtido por cada técnica estudada. \* representa os grupos para os quais foram encontradas diferenças significativas (A e B << C e D para a quantidade de DNA autossómico e do cromossoma Y).



## DISCUSSÃO

As duas técnicas para utilização de zaragatoas, nas quais se inclui as três variantes do método “clássico”, foram comparadas não só quanto à quantidade de DNA obtido em cada uma, mas também quanto à qualidade dos perfis obtidos.

Os resultados desta investigação demonstraram que, relativamente à qualidade dos perfis obtidos, recolher amostras recorrendo à *double swabbing technique* proporciona um maior número de perfis masculinos completos. Estes resultados, estão de acordo com estudos anteriores de Sweet et al. (1997) e de Pang and Cheung (2007), nos quais os autores também comparam este método com o método “clássico”, na recolha de saliva e de vestígios biológicos de superfícies/objetos. Os mesmos autores, acreditam que este método permite a recolha de maior quantidade de DNA, pois a utilização de uma primeira zaragatoa húmida permite hidratar e libertar as células, o que facilita a sua aderência às fibras da zaragatoa seca utilizada posteriormente. Seria então expectável, que este método, através do qual se obteve melhores resultados, fosse o que recolhesse a maior quantidade de amostra para analisar. No entanto, embora superior na qualidade de perfis genéticos obtidos, este estudo permitiu também concluir que não é o método que permite a recolha de maior quantidade de DNA, mas sim a variante do método “clássico” realizada rodando a zaragatoa e incluindo o ápice (alínea C).

O facto da alínea C do método “clássico” ter permitido a recolha de maior quantidade de DNA, quando comparado com a *double swabbing technique* poderá ser fruto do acaso e não uma garantia de que este método é realmente o que permite uma maior colheita de DNA. Esta hipótese é considerada, uma vez que as condições de recolha podem não ter sido as ideais em todas as amostras. Os casais voluntários podem ter cometido erros, não intencionais, no momento da colheita, no que respeita à uniformização da camada de sêmen espalhada para cada uma das técnicas e à distribuição na zaragatoa da respetiva amostra. Tal, poderá ter resultado em diferentes concentrações nas diversas zonas da zaragatoa, não garantido quantidades semelhantes de DNA em toda a sua superfície. Aliada a esta hipótese, este resultado pode estar relacionado, também, com os cortes efetuados na fase de extração, em que algumas amostras poderiam conter porções e proporções (diferente distribuição na zaragatoa) maiores do que outras.

Outros fatores poderão ter influência na fase de amplificação da análise, nomeadamente excesso de DNA, que poderá causar alguma inibição. Cada *kit* utilizado na fase de amplificação tem um limiar de DNA para o qual está otimizado.

A utilização do método “clássico”, de um modo geral, foi aquele que revelou os piores resultados, sendo que das três variantes, a alínea B, cujas as amostras foram recolhidas

rodando a zaragatoa sem incluir o ápice, foi aquela cuja qualidade de perfis masculinos obtidos foi inferior, manifestando a maior quantidade de amostras “sem perfil” do estudo, seguido das amostras recolhidas friccionando apenas uma das faces da zaragatoa (alínea A). Esta ausência de qualidade dos perfis poderá ser explicada pela baixa quantidade de DNA que estes métodos permitem recolher, o que é corroborado pela análise da quantificação das amostras, que também revela menor quantidade para a alínea B, seguida da A. A menor quantidade de DNA observada poderá ser explicada pela incorreta execução do método “clássico”, pois a utilização deste método de forma que não fique coberta toda a zaragatoa de vestígio compromete a análise, uma vez que, como já foi exposto, durante a fase de extração, apenas uma pequena porção da zaragatoa é cortada para prosseguir análise e não estando toda a sua superfície coberta de vestígio é possível que a porção cortada não contenha quantidade suficiente de DNA para analisar.

A análise estatística deste estudo revela que não existem diferenças significativas entre a quantidade de DNA obtido, entre as técnicas de rodar a zaragatoa incluindo o ápice e a “*double swabbing technique*”. Não obstante, a qualidade superior dos perfis obtidos com a segunda técnica merece que sejam realizados mais estudos no sentido de aferir se este método deverá ser adoptado num protocolo padronizado para recolha de amostras em casos de AS. Mais ainda, a investigação que se debruça sobre a comparação das diferentes formas de execução do método “clássico” é ainda escassa, sendo por isso necessários mais estudos que corroborem ou contestem as conclusões desta investigação.

As amostras para as quais não se obtiveram perfis masculinos através da análise de marcadores autossómicos foram posteriormente submetidas a análise de marcadores do cromossoma Y através da amplificação com o *AmpFISTR® Yfiler® Plus PCR Amplification Kit*. O objetivo era verificar a utilidade da análise destes marcadores em casos reais, nos quais também não fosse possível a obtenção de um perfil autossómico masculino, uma vez que este *kit* analisa especificamente o componente genético masculino. Neste caso, embora para algumas amostras o estudo destes marcadores acrescentasse informação relevante para a investigação (haplótipo mínimo), o seu estudo não foi tão útil quanto esperado, já que 80% das amostras revelaram ausência de haplótipos masculinos. De salientar que o estudo dos marcadores específicos do cromossoma Y foi apenas realizado para as amostras “sem perfil”, dos quais 90% (n=9) das amostras pertenciam às alíneas A e B, cuja quantidade de DNA se revelou significativamente inferior às alíneas C e D, pelo que a ausência de haplótipos masculinos será possivelmente proveniente da quantidade insuficiente de DNA nestas amostras, resultado da falibilidade dos métodos de recolha.

Estes resultados poderão indicar que nos casos em que não é sequer possível a obtenção de um perfil autossómico parcial, poderá significar amostras com uma quantidade insuficiente de DNA para análise, para os quais o estudo destes marcadores não mostrará ser vantajoso para a investigação, podendo necessitar-se, quando possível, uma nova recolha. Considera-se, por isso, que seria interessante a criação de um protocolo com um conjunto de critérios, que quando cumpridos, garantissem, com alguma segurança, a obtenção de perfis genéticos do cromossoma Y.

Sugerimos ainda que serão necessários mais estudos relativamente ao acondicionamento das zaragatoas utilizadas, já que é largamente conhecido e comprovado (Startari et al., 2013) que a presença de fungos provoca uma diminuição da quantidade de DNA humano extraível numa amostra, pelo que a contaminação de amostras forenses com este tipo de microrganismos deve ser evitada sempre que possível. Este estudo utilizou para alguns casais zaragatoas Invasive sterile EUROTUBO<sup>®</sup> Collection Swab (Deltalab), que são armazenadas dentro de um recipiente fechado, que não permite circulação de ar (Fig. 10).

Observou-se que as amostras recolhidas com este tipo de zaragatoas se mostraram mais propensas ao aparecimento de fungos (Fig. 12), ao contrário das amostras recolhidas com as zaragatoas Collection Swab Viscose (BIOPLASLAB<sup>®</sup>). Isto poderá ser explicado pela falta de circulação de ar dentro do recipiente da zaragatoa após o seu armazenamento, ou seja, é possível que algumas das amostras, embora tenham estado à temperatura ambiente durante 1h (tal como recomendado) não tenham secado completamente e quando fechadas no recipiente, ainda húmidas, tenha possibilitado o crescimento de fungos.

Com isto, podemos afirmar que, não só uma hora poderá não ser suficiente para garantir uma completa secagem da amostra, havendo necessidade de revisão sobre este tempo, mas também que as zaragatoas que armazenam as amostras em recipientes fechados podem propiciar o aparecimento de fungos, comprometendo desta forma a análise. Embora nesta investigação o aparecimento destes microrganismos não tenha tido implicações nos resultados finais, já que todas as amostras permitiram a obtenção de perfis masculinos completos, possivelmente por existirem em pouca quantidade ou pelos cuidados tomados durante a fase de corte das zaragatoas, será de igual forma importante selecionar as zaragatoas de acordo com as condições específicas de cada caso. Ou seja, se forem recolhidas amostras em condições que possam não permitir a secagem completa da zaragatoa antes do armazenamento, então é plausível que se utilizem preferencialmente zaragatoas cujo armazenamento permita entrada de ar.

## CONCLUSÕES

A investigação sobre técnicas de utilização de zaragatoas na recolha de amostras de AS é ainda escassa. Este estudo ofereceu algumas contribuições sobre este tema e algumas das suas implicações práticas na Genética Forense. Assim, conclui-se que:

1. Existem efetivamente diferenças entre os perfis obtidos quando recolhidos com diferentes métodos.
2. Neste estudo, as amostras recolhidas com as técnicas “clássicas” de utilização de zaragatoas não contêm quantidade suficiente de amostra para assegurar a obtenção de perfis genéticos completos, prevalecendo sobre elas a *“double swabbing technique”*.
3. Será importante implementar a criação de um protocolo padronizado de recolha e tratamento de amostras de casos de agressões sexuais, para os profissionais médicos e técnicos de laboratórios de Genética Forense envolvidos na investigação.
4. Estudos adicionais são necessários para que, em casos de agressões sexuais em que as amostras obtidas através do exame médico forense contenham pouca quantidade de DNA, o método de recolha seja tão eficiente quanto possível.

Será igualmente importante referir que as condições de recolha não são controladas pelo investigador, pelo que alguns erros podem ter sido cometidos nesta fase. O presente estudo demonstrou que este tema é relevante no âmbito forense, pelo que futuramente, será interessante complementar este estudo sob condições ainda mais controladas, com um tamanho amostral maior e mais heterogéneo.

## BIBLIOGRAFIA

Adamowicz, M.S., Stasulli, D.M., Sobestanovich, E.M., and Bille, T.W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PloS one* 9, e116351.

Allard, J.E., Baird, A., Davidson, G., Jones, S., Lewis, J., McKenna, L., Weston, C., Scrimger, D., and Teppett, G. (2007). A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Sci Justice* 47, 160-167.

APAV (2015). Estatísticas APAV: Relatório Anual 2015 (Associação Portuguesa de Apoio à Vítima).

Benschop, C.C., Wiebosch, D.C., Kloosterman, A.D., and Sijen, T. (2010). Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic science international Genetics* 4, 115-121.

Bogas, V. (2013). Métodos de extração de ADN de amostras expostas a diferentes condições - Estudo Comparativo In Faculdade de Medicina (Universidade do Porto).

Bozzo, W.R., Colussi, A.G., Ortiz, M.I., and Lojo, M.M. (2009). DNA Recovery from different evidences in 300 cases of sexual assault. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2, 141-142.

Butler, J.M. (2009). *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (Elsevier Inc.).

Butler, J.M., and Hill, C.R. (2010). *Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA* (Promega Corporation Website).

Cabral, C. (2011). Crimes e agressões sexuais. Contribuição para o estudo da realidade portuguesa na região da Cova da Beira. In *Ciências da Saúde* (Universidade da Beira Interior).

Catalin, M., Andrei, A., and Mitrasca, O. (n.d.). *Modern Methods of Collection and Preservation of Biological Evidence for Human Identification by DNA Analysis*.

Cybulska, B., and Forster, G. (2010). *Sexual assault: examination of the victim*.

Evidence, N.C.o.t.F.o.D. (2000). The future of forensic DNA testing: predictions of the Research and Development Working Group (Washington, DC: National Institute of Justice: <http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/183697.pdf>).

Garvin, A.M., Fischer, A., Schnee-Griese, J., Jelinski, A., Bottinelli, M., Soldati, G., Tubio, M., Castella, V., Monney, N., Malik, N., *et al.* (2012). Isolating DNA from sexual assault cases: a comparison of standard methods with a nuclease-based approach. *Investigative genetics* 3, 25.

Gingras, F., Paquet, C., Bazinet, M., Granger, D., Marcoux-Legault, K., Fiorillo, M., Séguin, D., Baltzer, F., Chamberland, C., and Jolicoeur, C. (2009). Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. *Forensic science international Genetics*.

Joki-Erkila, M., Tuomisto, S., Seppanen, M., Huhtala, H., Ahola, A., Rainio, J., and Karhunen, P.J. (2014). Clinical forensic sample collection techniques following consensual intercourse in volunteers - cervical canal brush compared to conventional swabs. *Journal of forensic and legal medicine* 27, 50-54.

Krug, E.G., Dahlberg, L., Mercy, J.A., and Lozano, R. (2002). *World report on violence and health* (Geneva: World Health Organization).

Magalhaes, T., Dinis-Oliveira, R.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. *ScientificWorldJournal* 2015, 365674.

Magalhães, T., Jardim, P., and Vieira, D. (2013). *Recomendações para a Realização de Exame Físico e Recolha de Vestígios em Vítimas de Alegada Agressão Sexual*, I.P. Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, ed.

Magalhães, T., and Vieira, D. (2013). *Agressões Sexuais. Intervenção Pericial Integrada*.

Marshall, P.L., Stoljarova, M., Larue, B.L., King, J.L., and Budowle, B. (2014). Evaluation of a novel material, Diomics X-Swab, for collection of DNA. *Forensic science international Genetics* 12, 192-198.

Mesquita, H. (2009). *Código Civil*, 16a Edição edn.

Newton, M. (2013). The forensic aspects of sexual violence. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 27, 77-90.

Pang, B.C., and Cheung, B.K. (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal medicine* 9, 181-184.

Purps, J., Siegert, S., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Salazar, R., Angustia, S.M., Santos, L.H., Anslinger, K., Bayer, B., *et al.* (2014). A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic science international Genetics* 12, 12-23.

Startari, L., Benoit, J.N., Quatrehomme, G., Carle, G., and Pognonec, P. (2013). Comparison of extractable DNA from bone following six-month exposure to outdoor conditions, garden loam, mold contamination or room storage. *Med Sci Law* 53, 29-32

Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J.A., Valenzuela, A., and Villanueva, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of forensic sciences* 42, 320-322.

Verdon, T.J., Mitchell, R.J., and van Oorschot, R.A. (2014). Swabs as DNA collection devices for sampling different biological materials from different substrates. *Journal of forensic sciences* 59, 1080-1089.

Vieira, S. (2010). Ofensores Sexuais: Das Crenças ao Estilo de Pensamento. In *Escola de Psicologia* (Universidade do Minho).

Weiler, N.E., Matai, A.S., and Sijen, T. (2012). Extended PCR conditions to reduce drop-out frequencies in low template STR typing including unequal mixtures. *Forensic science international Genetics* 6, 102-107.

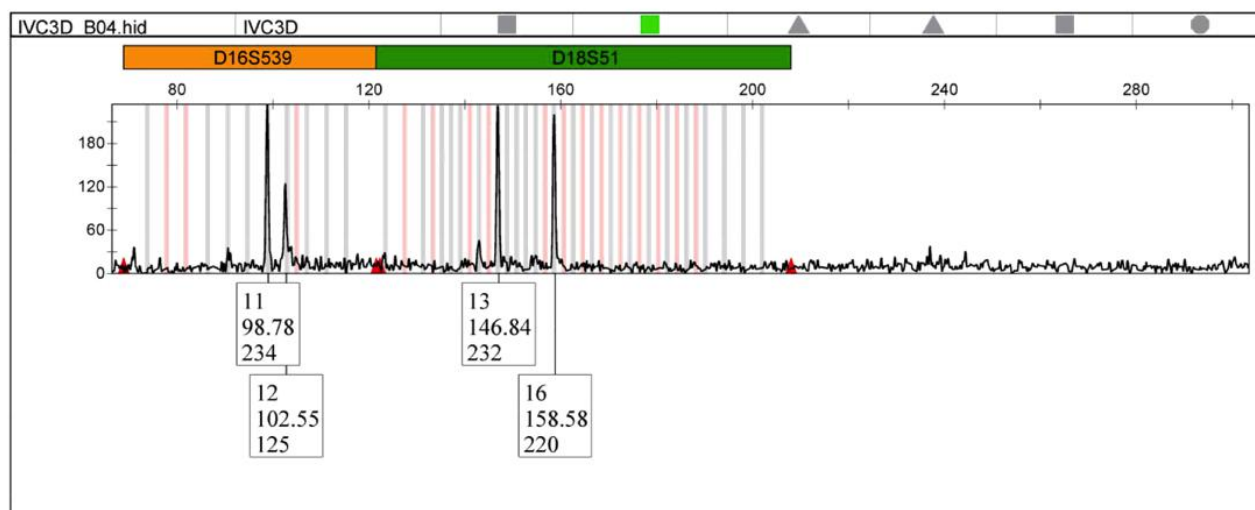
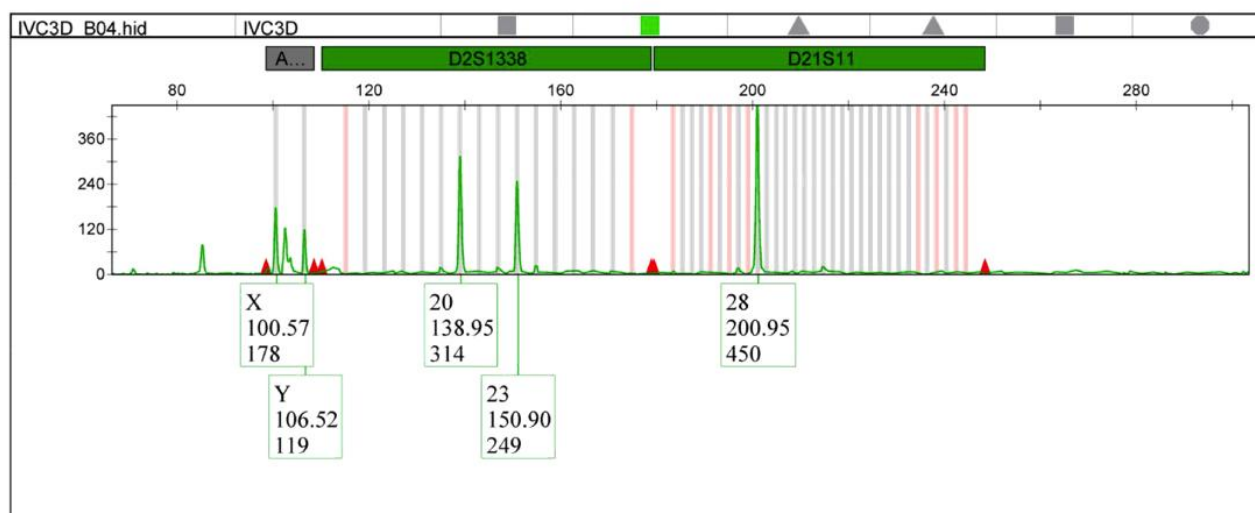
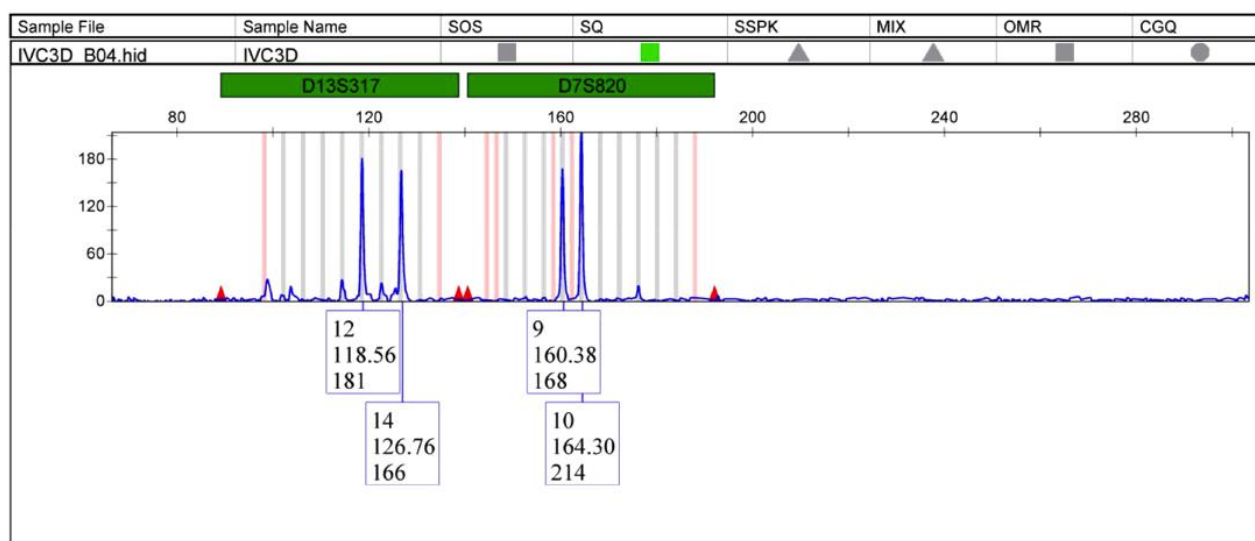
Williams, S., Panacek, E., Green, W., Kanthaswamy, S., Hopkins, C., and Calloway, C. (2015). Recovery of salivary DNA from the skin after showering. *Forensic science, medicine, and pathology* 11, 29-34.

## ANEXOS

Tabela VI. Resultados da quantificação em tempo real

	Alínea A (Friccionar uma das faces)			Alínea B (Rodar sem incluir o ápice)			Alínea C (Rodar incluindo o ápice)			Alínea D (“double swabbing technique”)		
	LA	SA	Y	LA	SA	Y	LA	SA	Y	LA	SA	Y
C1	0.19	0.13	0.07	0.37	0.23	0.15	0.92	0.84	0.69	0.57	0.36	0.33
C2	0.09	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.59	0.37	0.43	0.74	0.34	0.45
C3	0.09	0.08	0.05	0.16	0.14	0.08	0.39	0.39	0.32	0.44	0.35	0.27
C4	0.14	0.12	0.11	0.21	0.22	0.16	2.59	2.11	1.97	1.93	1.05	1.08
C5	0.08	0.06	0.06	0.14	0.09	0.09	0.48	0.36	0.38	2.60	1.37	1.63
C6	0.40	0.29	0.26	0.39	0.28	0.24	1.17	0.82	0.79	2.85	2.06	1.92
C7	0.66	0.65	0.48	0.11	0.13	0.08	5.10	5.03	3.89	0.37	0.37	0.29
C8	0.67	0.50	0.19	0.11	0.09	0.03	1.24	1.35	0.31	1.11	0.84	0.21
C9	0.17	0.13	0.11	0.34	0.32	0.25	1.49	1.51	1.52	1.29	1.18	1.05
C10	0.14	0.10	0.04	0.05	0.04	0.01	0.04	0.02	0.01	0.20	0.15	0.05
C11	0.55	0.28	0.25	0.36	0.25	0.17	0.36	0.28	0.21	2.75	1.89	1.37
C12	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.02	0.01	0.11	0.07	0.06
C13	0.95	0.73	0.55	0.11	0.09	0.06	32.24	25.03	3.84	5.99	4.60	1.26
C14	0.27	0.22	0.17	0.20	0.14	0.09	1.06	0.81	0.24	0.93	0.61	0.42





AB Applied Biosystems  
GeneMapper® ID-X 1.4

Project: 2016-05-27\_Minifiler\_C\_D\_3500

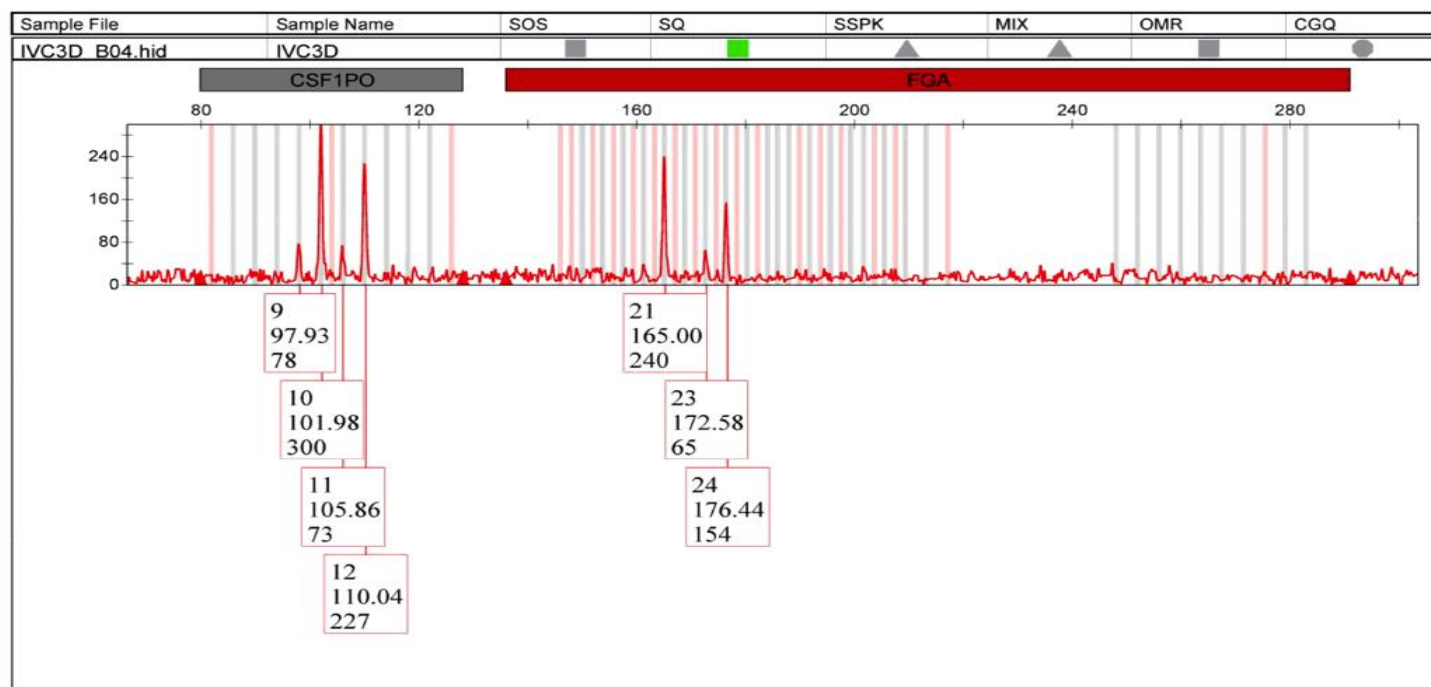
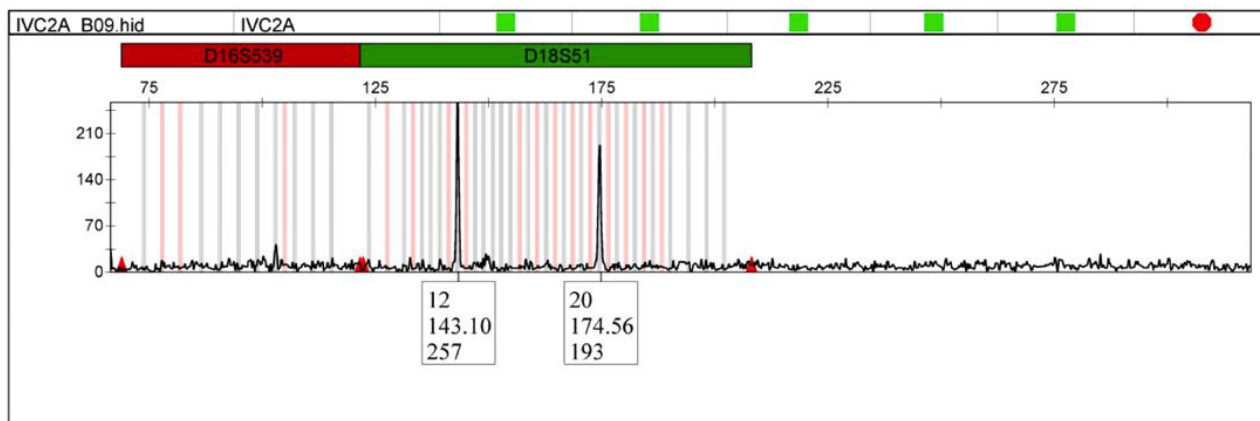
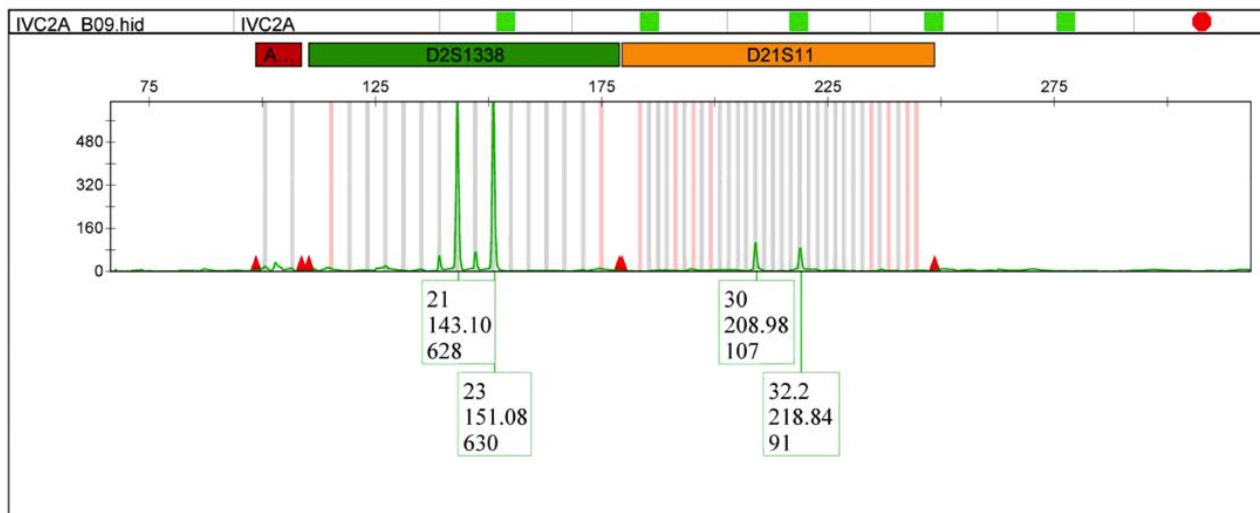
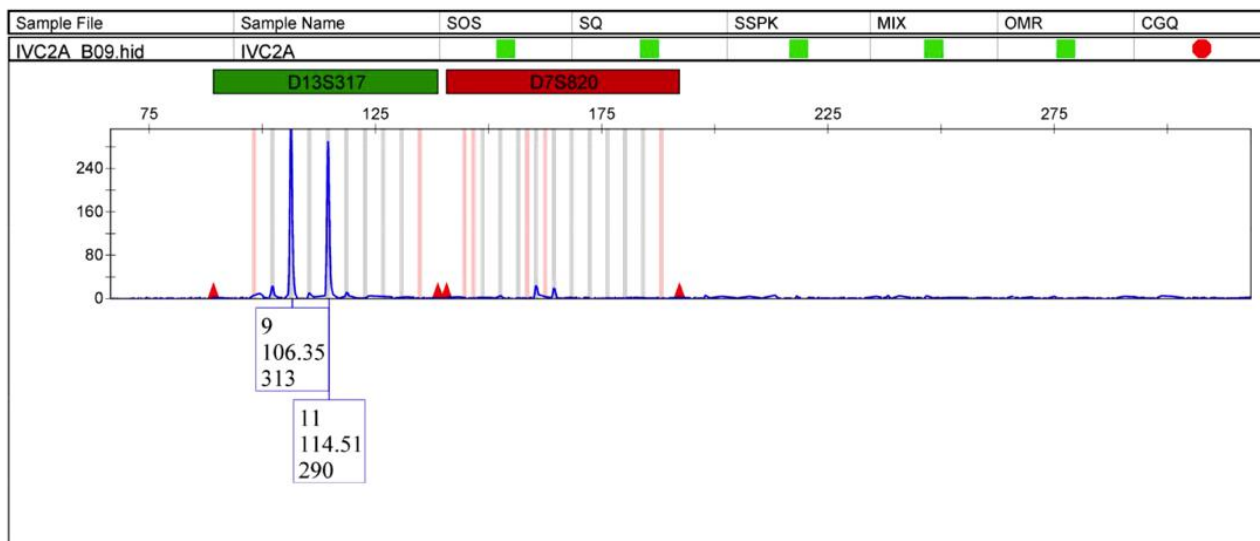


Fig. 13 Exemplo de perfil genético masculino completo



AB Applied Biosystems  
GeneMapper® ID-X 1.4

Project: 2016-05-18\_Minifiler\_A\_B\_3500

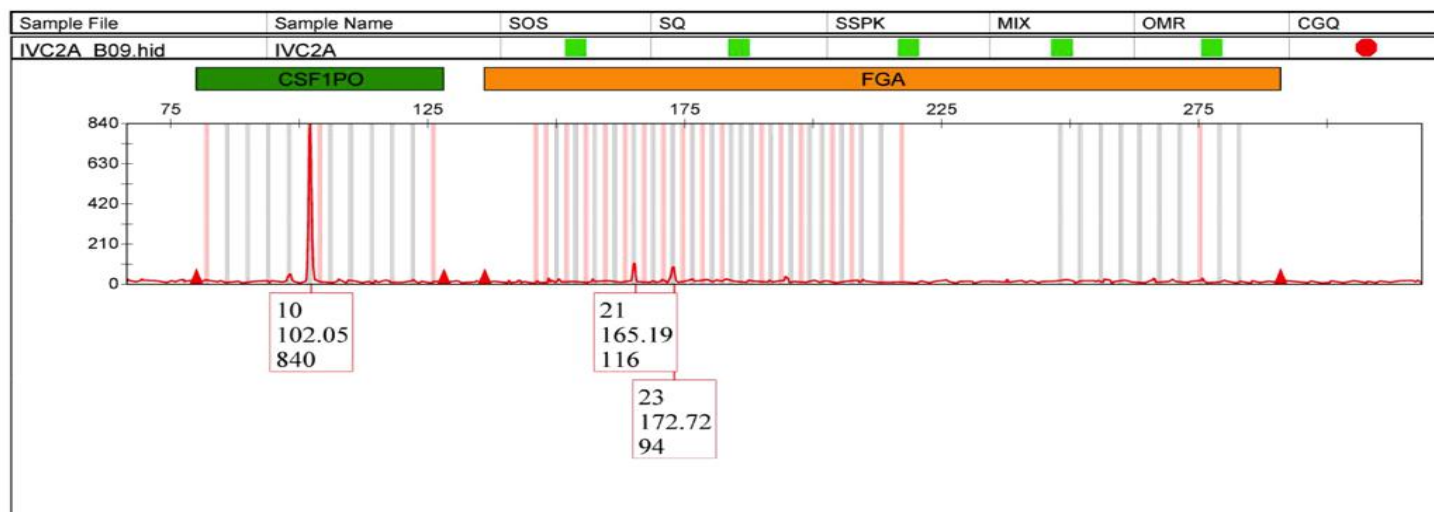
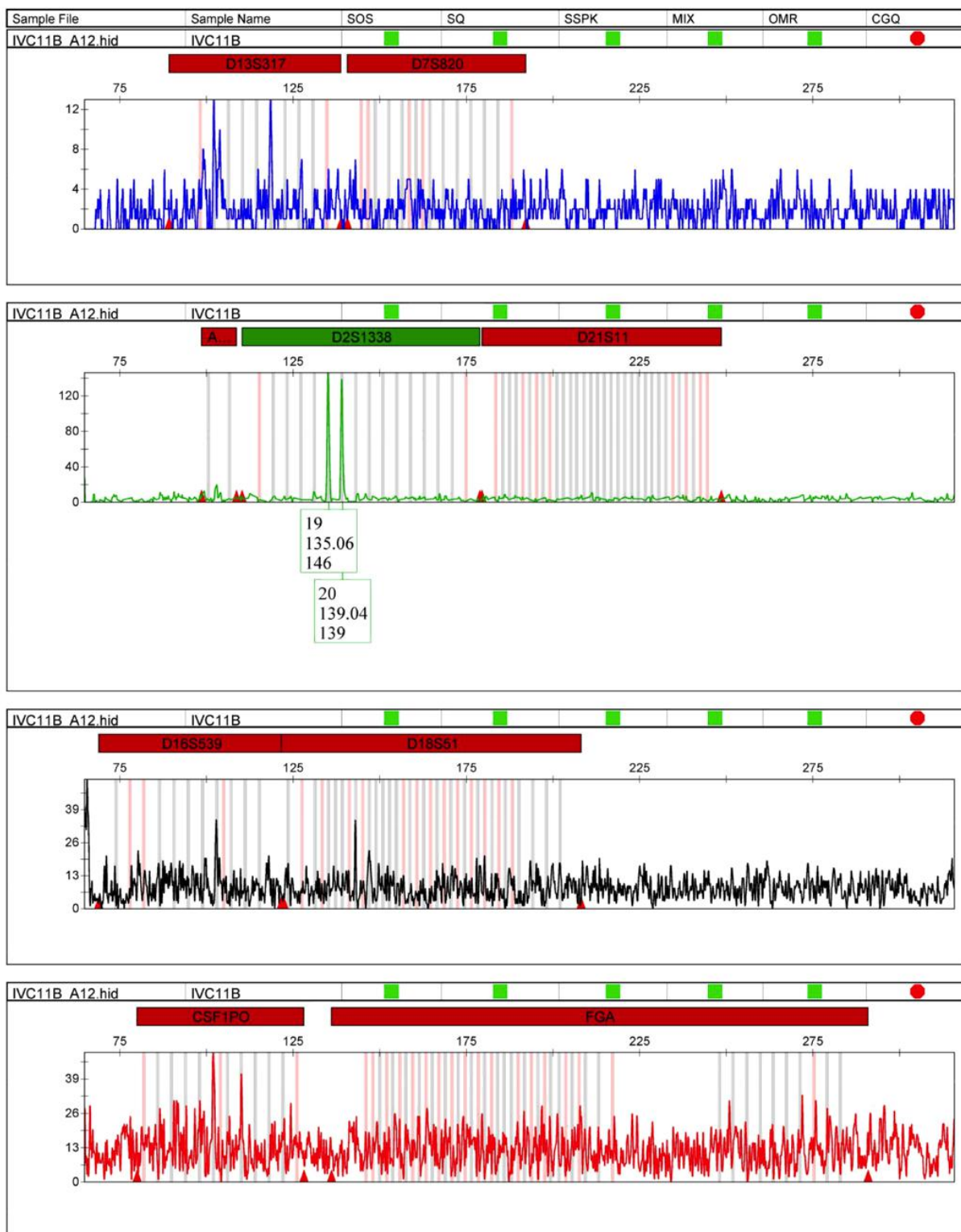


Fig. 14 Exemplo de perfil genético masculino incompleto

AB Applied Biosystems  
GeneMapper® ID-X 1.4

Project: 2016-05-18\_Minifiler\_A\_B\_3500



Tue May 24, 2016 11:12AM, PDT

Printed by: gmidx

Page 1 of 1

Fig. 15 Exemplo de amostra “sem perfil” genético masculino

# DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

*Considerando a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial  
(Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000)*

## **Análise de DNA e agressão sexual – contribuição para o aperfeiçoamento da gestão e análise de vestígios biológicos forenses**

**Eu, abaixo-assinado,** \_\_\_\_\_, tomei conhecimento do estudo em que serei incluído(a) e compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da investigação que se tenciona realizar. Foi-me ainda dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias e de todas obtive resposta satisfatória.

Foi-me dado a conhecer que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto da investigação em curso.

Foi-me ainda explicado que os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos e ser objeto de publicação, mas que os elementos da identidade pessoal serão sempre tratados de modo estritamente confidencial, uma vez que apenas o investigador principal terá acesso ao documento onde se encontram as concordâncias entre o código dado à amostra e os dados dos participantes.

Também me foi esclarecido que o material biológico colhido será destruído após o estudo e nunca será usado para qualquer outra finalidade. Por fim, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo.

Aceito participar de livre vontade no estudo acima mencionado.

Concordo que seja efetuada a colheita de amostras biológicas para realizar as análises e os estudos genéticos que fazem parte desta investigação.

Também consinto a divulgação dos resultados obtidos no meio científico, desde que seja garantido o seu anonimato.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 201\_\_

**Assinatura do voluntário:** \_\_\_\_\_

**O Investigador responsável:** \_\_\_\_\_

## INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE

**Título do estudo: DNA testing and sexual assault – contribution to the improvement of the management and analysis of forensic biological traces** (Análise de DNA e agressão sexual – contribuição para o aperfeiçoamento da gestão e análise de vestígios biológicos forenses)

Este documento contém informação sobre o estudo realizado no âmbito da Tese de Doutoramento de Benedita Abreu Ferreira da Silva, estudante da Universidade do Porto, intitulado “DNA testing and sexual assault – contribution to the improvement of the management and analysis of forensic biological traces”. Para a sua realização necessito da colaboração de alguns casais.

Se ao ler esta folha de ‘Informação ao Participante’ houver algo que não entenda, ou se quiser mais esclarecimentos sobre o estudo, esteja à vontade para colocar as suas questões.

### Qual o objetivo do estudo?

A violência sexual afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo as vítimas, normalmente, do sexo feminino. Esta prática pode provocar lesões graves e permanentes para a saúde física e mental das vítimas, sendo, portanto, o seu estudo de suma importância. Por vezes, por vergonha ou desconhecimento da vítima, pelo tipo de práticas sexuais realizadas ou, até mesmo, pelos cuidados tidos em conta pelo agressor, os vestígios biológicos encontrados, após análise, não permitem obter resultados conclusivos. Este facto leva a que o agressor não seja identificado.

É, portanto, o objetivo desta investigação estudar os novos materiais, metodologias e técnicas, de forma a tentar perceber quais são as que permitem a obtenção de bons resultados, mesmo quando os vestígios não se encontram nas quantidades e condições ideais.

### O que irei fazer se aceitar participar?

Será pedido aos participantes do sexo masculino amostras de sêmen e saliva que serão recolhidas pelo próprio num recipiente esterilizado e próprio para o efeito. Aos elementos do sexo feminino serão depositadas nos seus antebraços, por várias vezes, diversas quantidades de material biológico do seu respetivo companheiro, para posteriormente se proceder à recolha deste, usando zaragatoas.

A recolha das amostras poderá exigir que os participantes se tenham de deslocar ao INMLCF, I.P. pelo menos duas vezes, por forma a conseguirmos obter a quantidade de sêmen e saliva necessária para as diferentes etapas deste projeto.

Aquando da recolha do material biológico serão explicadas as diferentes fases de processamento das amostras.



Pósteres apresentados em Congressos/Conferências no âmbito deste projeto

- 1º Congresso Associação Portuguesa de Ciências Forenses/4º Congresso Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada - 12 e 13 de Fevereiro



## REVIEW: MÉTODOS DE RECOLHA DE VESTÍGIOS BIOLÓGICOS EM CASOS DE AGRESSÃO SEXUAL

A. Capitão<sup>1\*</sup>, M. Gouveia<sup>2\*</sup>, B. Silva<sup>2</sup> e L. Cainé<sup>3,1</sup>

\* igual contribuição de autores

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Legal e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal

<sup>3</sup> Serviço de Genética e Biologia Forenses, Delegação do Norte, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

### Introdução

A análise de ADN é muito importante na resolução de agressões sexuais (AS) pela facilidade com que o agressor pode deixar vestígios biológicos. Esta permite eliminar potenciais suspeitos, ou colocá-los no local do crime.

A análise de zaragatoas vaginais e anais, bem como das cuecas da vítima são amostras comuns em AS, uma vez que as vítimas são maioritariamente indivíduos do sexo feminino e o sêmen apresenta-se como vestígio biológico de eleição a analisar.

Nestes crimes as amostras normalmente possuem pouca quantidade de ADN masculino e a recolha raramente é feita logo após o ato. De referir que os têxteis analisados se podem apresentar problemáticos para análise, por possuírem inibidores de PCR ou um elevado espaçamento entre as fibras, impedindo a retenção da amostra.

Aumentar o nº ciclos na PCR ou utilizar mini-STRs são algumas sugestões para ultrapassar estes problemas, no entanto estes podem resultar em Allele drop-in ou aumento de stutters.

Assim, melhorar as técnicas de recolha consiste no próximo passo para tentar melhorar a obtenção de resultados genéticos.

### MÉTODOS DE RECOLHA

#### Análise de Tecidos

No caso dos vestígios estarem contidos em têxteis, é necessário ter em conta os corantes utilizados no fabrico dos mesmos (e.g. indigo dye, presente na ganga, é um conhecido inibidor da PCR).

Os métodos utilizados para recolha de material biológico em tecidos incluem:

- 1) Cortar parte do tecido na zona de interesse e armazenar num tubo estéril;
- 2) Utilizar uma zaragatoa de algodão estéril friccionando a ponta sobre a superfície do tecido; considera-se ser este o método mais adequado;
- 3) Pressionar uma fita adesiva sobre o tecido e, de seguida, cortar a fita para dentro de um tubo estéril.

#### Análise de Zaragatoas

Existem várias técnicas associadas ao uso da zaragatoa na recolha de material biológico ficando, geralmente, ao critério do perito que executa a perícia qual utilizar:

- 1) Uma zaragatoa - passagem da zaragatoa no vestígio, rodando-a, assegurando que toda a ponta entra em contacto com o vestígio;
- 2) Duas zaragatoas simultaneamente - método similar ao primeiro, mas que acrescenta o uso de duas zaragatoas, ao mesmo tempo; apresenta a desvantagem de dispersar os vestígios pelas duas zaragatoas, o que afeta a análise;
- 3) "Double swabbing technique" - utilização de duas zaragatoas: a primeira humedecida, e logo de seguida é passado no mesmo local uma segunda zaragatoa seca. A eficiência deste método relativamente aos outros começa a ser testada, no entanto, a maioria dos peritos privilegia ainda o uso do primeiro método.

### Conclusões

Quando a qualidade e quantidade de ADN nas amostras forenses é diminuta, é essencial que o método de recolha seja o mais eficiente possível.

Esta revisão pretende salientar a importância da criação de um protocolo padronizado, que vise a obtenção de boas amostras em casos de AS, no sentido de:

- maximizar a eficiência das análises efetuadas;
- evitar casos de vitimização secundária;
- evitar perda de amostras essenciais;
- garantir uma transferência mínima de inibidores e simultaneamente um máximo possível de amostra.

#### Referências Bibliográficas

1. Nagahdes, T., Dina-Oliveira, B.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal* 2015.
2. Adamowicz, M.S., Masarik, D.M., Solostanowski, E.M., and Bille, T.W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PLoS one* 9, e124553.
3. Unaro, A., Pelarik, V., Swiran, Y.C., and Tobe, S.S. (2010). Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Sci Int-Genet* 4, 137-141.
4. Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J.A., Valenzuela, A., and Vladimirova, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Sciences* 42, 320-322.

1º Congresso Associação Portuguesa de Ciências Forenses

4º Congresso Sociedade Portuguesa para o Estudo da Criança Abusada e Negligenciada - 12 e 13 de Fevereiro

Nota: Trabalho realizado no âmbito do Programa Doutoral em Ciências Forenses e Mestrado em Genética Forense



- 9<sup>th</sup> Edition IJUP – Encontro de Investigação Jovem da Universidade do Porto – February 17<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup>.

## COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR SEMEN COLLECTION (SINGLE SWAB, TWO SIMULTANEOUS SWABS OR DOUBLE SWABBING TECHNIQUE) IN ORDER TO CONCLUDE WHICH RESULTS IN THE BEST DNA PROFILES

A. Capitão<sup>1</sup>, B. da Silva<sup>2</sup>, M. Gouveia<sup>1</sup>, L. Cainé<sup>2,3</sup> e J. Cerqueira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Equal author contribution

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal

<sup>2</sup> Department of Legal Medicine and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

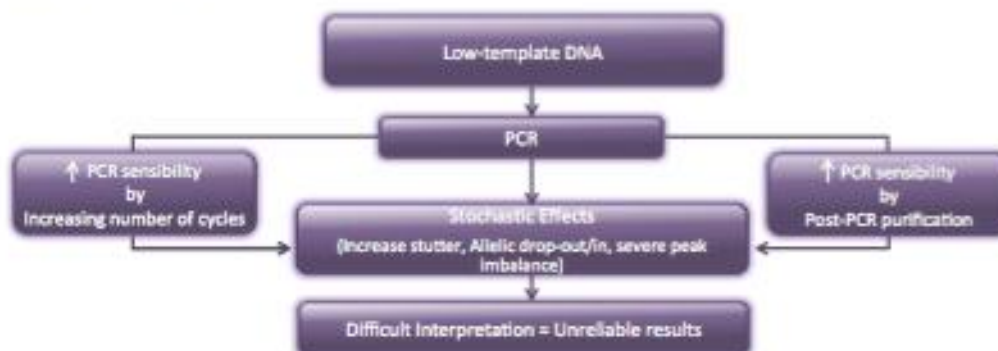
<sup>3</sup> Department of Forensic Genetics and Biology, North Delegation, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences

### Introduction

The analysis of biological materials, in particular DNA, is of great relevance when dealing with sexual assaults (SA), since the perpetrator can easily leave his traces on the victim. These traces could associate the suspect to the victim, but the success of that association is contingent upon the success with which the samples that could potentially belong to the aggressor are collected.

Semen is an extremely important biological material in SA cases, since this type of crime affects mostly women. As such, vaginal and anal swabs are very commonly analysed in forensics.

The amount of DNA available is an essential factor for the success of the analysis, since low-template DNA samples can lead to complications when interpreting. Samples collected from SA cases are rarely from right after the assault and thus usually yield little quantity of male DNA.



Improving the collection method in order to increase the amount of DNA available is probably the most reliable way to improve the analysis.

There are several swabbing techniques and it is usually left to the specialist which one to use:

Single swab	Two simultaneous swabs	Double swabbing technique
<ul style="list-style-type: none"> <li>Using a single swab, ensuring the whole tip comes in contact with the evidence.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Differs from the first method only by the use of two swabs at the same time, instead of just one;</li> <li>Compared to the other methods, it has the disadvantage of dividing the trace evidence, leaving each swab with less quantity, affecting the analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A first wet swab is rolled over the trace evidence and is immediately followed by a second dry swab;</li> <li>Studies have already shown the greater efficiency of this technique, however most professionals still prefer the use of a single swab.</li> </ul>

### Conclusion

The amount and quality of DNA in a sample is an extremely important factor for a successful analysis. Consequently, it is essential that the collection method is as exhaustive and efficient as possible, thus dictating the resolution (or not) of a crime.

This review intends to emphasize the importance of a standardized protocol that allows the best possible samples in SA cases, in order to maximize the efficiency of the analysis and avoid cases of secondary victimization.

### References

1. Magalhães, T., Dinis-Oliveira, R.I., Silva, B., Correia, F., and Hano-Vieira, D. (2015). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal* 2015.
2. Adamowicz, M.S., Szasli, O.M., Sobestianovich, I.M., and Bille, T.W. (2014). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PLoS one* 8, e116953.
3. Sweet, D., Lorenz, M., Lorenz, J.A., Valenzuela, A., and Villanueva, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double-swab technique. *Journal of Forensic Sciences* 42, 320-322.

- 17<sup>th</sup> Meeting Portugalæ Genetica – March 17<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup>



## REVIEW: SWABBING TECHNIQUES FOR SEMEN COLLECTION IN SEXUAL ASSAULT CASES

A. Capão<sup>1\*</sup>, B. da Silva<sup>2\*</sup>, M. Gouveia<sup>3</sup>, J. Cerqueira<sup>3</sup> and L. Caimó<sup>2,3</sup>

\*Equal author contribution

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal

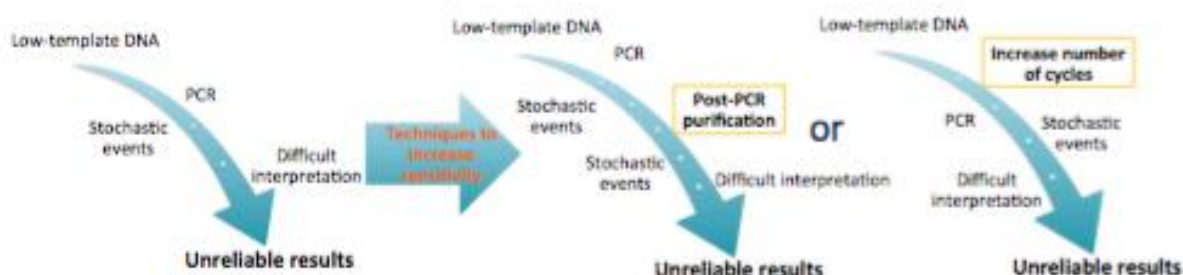
<sup>2</sup>Department of Legal Medicine and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

<sup>3</sup>Department of Forensic Genetics and Biology, National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P. – North Delegation, Portugal

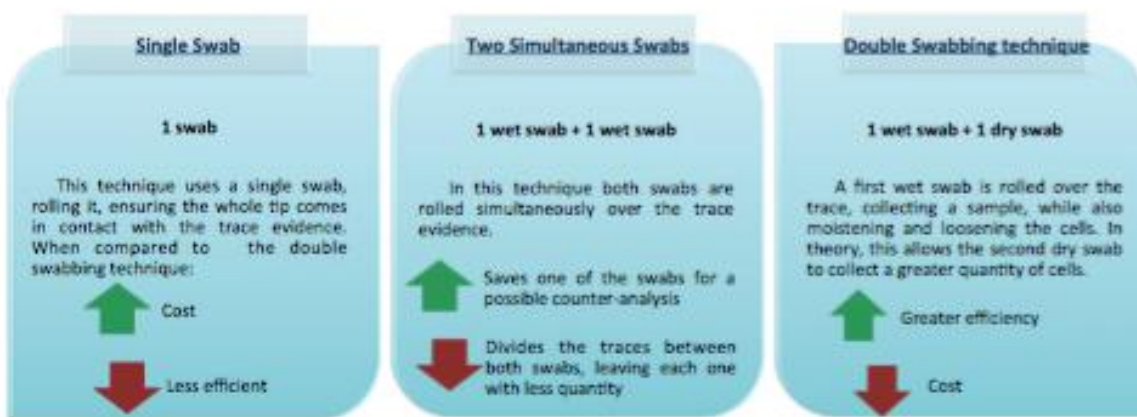
### Introduction

Sexual assaults (SA) are one of the most prevalent crimes in our society. This type of crime affects mostly women. Thus the detection of semen on the victim and the crime scene is essential in order to prove sexual contact and to identify the perpetrator, through DNA analysis.

The amount of DNA available in biological samples is an essential factor for the success of the analysis. Forensic samples in SA cases frequently contain degraded or little amount of DNA due to the time lag between the assault and the forensic medical exam (FME). Although methods have been studied to increase the sensitivity of the PCR, most still result in stochastic events and consequently unreliable results.



As a result, it has been suggested that the most reliable way to obtain the best possible profiles is through improving the collection method itself. There are several swabbing techniques for sample collection from the victim and it is left to the medical professional which one to use. These methods include:



### Conclusion

In SA cases, where the samples obtained through FME generally contain little amount of DNA, it is essential that the collection method is as efficient as possible, in order to obtain the maximum amount of DNA possible. Considering this scenario, the results will prove to be more reliable and may dictate a good contribution of the Forensic Genetics in the resolution of the crime.

The present review intends to emphasize the importance of the creation of a standardized protocol that ensures the collection of the best possible samples in SA cases, consequently resulting in less cases of secondary victimization.

### References

1. Magalhães, T., Góis-Oliveira, B.J., Silva, B., Corte-Real, F., and Nuno-Vieira, G. (2003). Biological evidence management for DNA analysis in cases of sexual assault. *The Scientific World Journal* 2003.
2. Arjenowicz, M.S., Stead, D.M., Sobersanovich, E.M., and Bille, T.W. (2004). Evaluation of methods to improve the extraction and recovery of DNA from cotton swabs for forensic analysis. *PLoS one* 5, e118883.
3. Sweet, D., Lorenz, M., Lorenz, J.A., Valenzuela, A., and Villanueva, E. (2007). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Sciences* 42, 320-322.